

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Centro de Biotecnologia da UFRGS

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Construção e caracterização de espécies híbridas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces kudriavzevii* com possível aplicação na indústria cervejeira

Marcelo Menoncin

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

**Porto Alegre
Dezembro de 2019**

Instituições e fontes financiadoras

Agências financiadoras

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Instituição de origem

Grupo de Estudos de Leveduras Cervejeiras (GELC), sala 107
Centro de Biotecnologia da UFRGS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

“We live in a society exquisitely dependent on science and technology, in which hardly anyone knows anything about science and technology.”

- Carl Sagan

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que tornaram esse trabalho possível. Acima de tudo, sou grato aos pesquisadores brasileiros, que em tempos de tormenta, encontram força para continuar o que é imprescindível para o crescimento de qualquer nação: a Ciência.

Estrutura da dissertação

Essa dissertação de mestrado é dividida em introdução geral, um capítulo redigido em forma de artigo, discussão geral, conclusões gerais e conclusões específicas. Ainda, nos adendos, foi incluído um artigo de revisão redigido ao longo do período de mestrado e que já está publicado.

Na introdução geral é apresentado um breve histórico da cerveja e a sua importância, bem como uma descrição sucinta das matérias-primas e processos empregados na indústria cervejeira. Além disso, o tópico de leveduras cervejeiras é abordado, onde são descritas as cepas disponíveis para indústria, além da busca por alternativas. O seguinte tema é o estudo de cepas híbridas interespecíficas e a sua aplicação em pesquisas básicas. Por fim, as cervejas de fazenda norueguesas (*Norwegian farmhouse ales*) são descritas.

Os resultados discorrem sobre a geração e a caracterização dos híbridos interespecíficos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* gerados nesse trabalho, na forma de artigo com a formatação original em que será submetida ao periódico *Yeast*. Cabe ressaltar que o artigo foi escrito em conjunto com Grupo de Estudos de Leveduras Cervejeiras (GELC), uma vez que os dados fazem parte de uma pesquisa mais abrangente envolvendo a geração de híbridos entre leveduras usadas na fabricação de *farmhouse ales* norueguesas e belgas com *S. kudriavzevii*.

Finalmente, há uma discussão geral acerca dos resultados, bem como suas conclusões gerais e específicas, e perspectivas.

Nos adendos está inserido o artigo publicado no periódico *Journal of the Institute of Brewing* intitulado *Molecular and Biochemical aspects of Brettanomyces in Brewing*.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	7
Resumo.....	9
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1 Breve histórico e importância da cerveja.....	11
1.2 Cerveja: matérias-primas e processo.....	12
1.3 Leveduras cervejeiras: cepas disponíveis e a busca por alternativas.....	15
1.4 Surgimento de híbridos na natureza e a aplicação em laboratório.....	17
1.5 Norwegian farmhouse ales (Cervejas de fazenda norueguesas) e suas leveduras (Kveiks).....	18
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Resultados.....	24
4. Discussão geral.....	26
5. Conclusão geral.....	28
6. Conclusões específicas.....	28
7. Perspectivas.....	29
8. Referências complementares.....	30
9. Apêndice.....	33

Lista de abreviaturas

°P- Unidade de medida de densidade em graus Plato (g/100 mL)

ATF1 – Gene codificante para a enzima *alcohol acetyltransferase 1*

IBU - *International Bitter Units*

ITS1 - Região ITS1 (*Internal Transcribed Spacer*)

ITS2 - Região ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*)

Kg/cm³ - Unidade de medida de densidade em quilogramas por centímetro cúbico

KKH1 - Híbrido 1 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Voss Kveik e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

KKH2 - Híbrido 2 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Voss Kveik e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

KKH3 - Híbrido 3 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Voss Kveik e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

KWH1 - Híbrido 1 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

KWH2 - Híbrido 2 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

KWH3 - Híbrido 3 entre a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III e a cepa tipo de *Saccharomyces kudriavzevii*

Lys- - Mutantes auxotróficos para lisina

NCYC - *National Collection of Yeast Cultures*

NCYC2889 - Cepa tipo de *S. kudriavzevii*

Ura- - Mutantes auxotróficos para uracila

WLNIII - Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Wallonian III

YPM - Meio composto com extrato de levedura, peptona e extrato de malte

ATF2 - Gene codificante para a enzima *alcohol acetyltransferase 2*

PAD1 - Gene codificante para a enzima *phenylacrylic acid decarboxylase*

FDC1 - Gene codificante para a enzima *ferulic acid decarboxylase*

4-VG - 4-vinilguaiacol

GC-FID - Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização de Chama

FLO1, FLO5, FLO8, FLO9, FLO10 e FLO11 - Genes codificante para as floculinas

STAI - Gene codificante para a enzima *glucoamylase*

Resumo

Leveduras híbridas intra e interespecíficas vem sendo construídas em laboratório visando ampliar a compreensão acerca das características fenotípicas e genotípicas de diferentes híbridos e o fornecimento de novas cepas ao mercado cervejeiro. Na presente pesquisa, foram gerados dez híbridos únicos entre a espécie criotolerante *Saccharomyces kudriavzevii*, que é relacionada à fermentação de vinhos e cervejas, e a espécie termotolerante *S. cerevisiae*, isolada de um ambiente relacionado às *farmhouse ales* do município de Voss, Condado de Hordaland, Noruega. As cepas híbridas resultantes possuem heterose em relação as parentais, possuindo boa performance fermentativa em baixas e altas temperaturas (17 °C, 25 °C e 37 °C) e alcançando altos valores de atenuação aparente. As cervejas obtidas com as cepas híbridas possuem um pH final de 3,70-4,4 após a fermentação nas temperaturas de 17 °C, 25 °C e 35 °C. Ainda, as cepas híbridas possuem a capacidade de gerar compostos aromáticos frutados como os ésteres pentanoato de etila (que remete à maçã vermelha e melão), hexanoato de etila (maçã e anis-estrelado), cinamato de etila (frutado) e acetato de feniletila (doce, mel e floral) que foram produzidos acima do limiar de percepção apenas pelos híbridos na temperatura utilizada para esse teste (25 °C), além de decanoato de etila (*brandy*, frutado e uva) que foi produzido também em níveis perceptíveis pelas cepas parentais. Os resultados dessa pesquisa indicam que a cepa Voss Kveik (*S. cerevisiae*) pode servir como chassi para a geração de novos híbridos interespecíficos e a possibilidade de uma ampla aplicação dos híbridos caracterizados (KKH1-KKH3) na indústria vinícola e cervejeira.

Abstract

Intra and interspecific hybrid yeasts have been built in the laboratory to broaden understanding of the phenotypic and genotypic characteristics of different hybrids and the supply of new strains to the beer market. In the present work, 10 unique hybrids were generated between cryotolerant wine and beer-associated *S. kudriavzevii* along with the heat-tolerant *S. cerevisiae* isolated from farmhouse brewing-related environment in Voss, Hordaland County, Norway. The resulting hybrid strains have heterosis in comparison to parental, good fermentative performance at low and high temperatures (17 ° C, 25 ° C and 37 ° C) and achieve high apparent attenuation values. Beers obtained with hybrid strains have a final pH of 3.70-4.4 after fermentation at temperatures of 17 ° C, 25 ° C and 35 °C. Further, the hybrids demonstrated capacity to generate pleasant fruity volatile compounds like the esters ethyl pentanoate (red apple and melon flavours), ethyl hexanoate (apple and aniseed), ethyl cinnamate (fruity) and phenethyl acetate (sweet, honey and floral) that was produced above the threshold only by the hybrids at the temperature utilized in the fermentation tests (25 °C) along with ethyl butanoate (pineapple, mango, tropical fruit), diethyl succinate (fruity) and ethyl decanoate (brandy, fruity and grape) that was also produced in perceptible levels by the parental strains. The results of this research indicate that the Voss Kveik strain (*S. cerevisiae*) could serve as chassis for generation of new interspecific hybrids and a possibility for a broad application of the characterized KKH1-KKH3 in the industry, including those of bioethanol, wine and beer.

1. Introdução

1.1 Breve histórico e importância da cerveja

A possibilidade de estabelecer-se em localidades que permitiam o cultivo de alimentos transformou o modo de vida do homem no período do Neolítico, que migrou do nomadismo para o sedentarismo. Foi no Crescente Fértil que grãos como o trigo e a cevada passaram a ser plantados e estocados para a alimentação de povos residentes no que antes correspondia ao Antigo Egito e a Mesopotâmia. Além de compor a base para a fabricação de pão, esses ingredientes também eram utilizados para a produção de cerveja, bebida que resulta da fermentação dos açúcares extraídos dessas matérias-primas (HORNESEY, 2003).

A cerveja apresenta valores nutricionais, socioeconômicos e políticos desde sua origem, sendo indicadora de complexidade social em sociedades antigas (HORNESEY, 2003). Além de importante fonte nutricional, também contribuiu para a reorganização da agricultura, mobilização de trabalho, distribuição centralizada e como símbolos de poder das elites detentoras dos poderes políticos, econômicos e religiosos (JOFFE, 1998).

Por se tratar de uma bebida segura do ponto de vista microbiológico, devido ao seu processo de fabricação que envolve a fervura, a adição de ervas com potencial bacteriostático como *gruit* e lúpulo, baixos valores de pH (próximos de 5,0), etanol e gás carbônico, a cerveja é considerada uma importante fonte de água potável ao longo de toda Idade Média. Nesse período, o consumo de água era a principal via de transmissão de doenças, já que não havia saneamento básico, o que causava a contaminação dos lençóis freáticos (UNGER, 2004).

Atualmente, a produção de cerveja compõe uma significativa parcela na economia mundial e geração de empregos, com produção de 1,94 bilhões de hectolitros registrados no ano de 2018 (<https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>). No contexto mundial, o Brasil é o terceiro maior fabricante mundial de cervejas, com produção de aproximadamente 140 milhões de hectolitros registrados no ano de 2016, perdendo apenas para a líder China (460 milhões de hectolitros) e EUA (221 milhões de hectolitros). Com esses valores, o Brasil apresenta maior produção do que países relevantes no cenário cervejeiro mundial como Alemanha (95 milhões de hectolitros) e Rússia (78 milhões de hectolitros) (BARTH-HASS, 2016; CERVBRASIL, 2016). Além disso, o número de cervejarias no Brasil vem aumentando exponencialmente

nos últimos dez anos, apresentando, no ano de 2018, cerca de 889 cervejarias (MARCUSO, 2018).

1.2 Cerveja: matérias-primas e processo

A cerveja é composta, principalmente, por quatro ingredientes, que são: água, malte, lúpulo e levedura. A água compõe cerca de 95% das cervejas (sendo o restante composto majoritariamente por etanol) e precisa atender determinadas características físico-químicas (composição salina, pH, dureza e alcalinidade) e microbiológicas (ausência de enterobactérias) para ser utilizada na fabricação cervejeira, podendo sofrer ajustes como adição de sais e ácidos, destilação, osmose reversa, entre outros processos usados na cervejaria (KUNZE, 2014).

O malte, por definição, é o resultado da modificação sofrida por cereais como a cevada, o trigo e a aveia durante o processo de malteação. A Malteação subdivide-se, basicamente, em 3 etapas: maceração, germinação e secagem. Durante a maceração, o grão é umedecido, induzindo sua germinação. Nesse passo, ocorre a ativação dos mecanismos de crescimento do grão, em especial, a ativação de α - e β -amilases que degradam o amido presente no endosperma em carboidratos de menor peso molecular, como glicose, frutose, maltose e maltotriose e dextrinas. Além disso, há a indução de proteases que degradam proteínas presentes no grão, gerando aminoácidos e peptídeos. Os carboidratos serão subsequentemente fermentados parcial ou totalmente no processo de fermentação, utilizando, para tanto, aminoácidos, peptídeos, compostos nitrogenados, íons metálicos, vitaminas e lipídeos oriundos do malte. Durante o processo de secagem, a germinação do grão é interrompida a temperaturas que variam de aproximadamente 20 °C a 85 °C. A temperatura de secagem interfere diretamente nas características organolépticas do malte, de modo que temperaturas baixas favorecem o desenvolvimento de maltes claros, como, por exemplo, o malte Pilsen e temperaturas altas, a produção de maltes de coloração mais escura, como no processo de produção de maltes torrados. A malteação é imprescindível para a fase quente do processo de fabricação cervejeira, denominada brassagem (descrição abaixo), etapa em que o amido tem sua conversão em carboidratos fermentescíveis a partir das amilases desenvolvidas na germinação. (KUNZE, 2014).

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta utilizada na cerveja para conferir amargor, aroma e sabor às cervejas, e por apresentar características bacteriostáticas, conservantes

e antioxidantes. Sua implementação ocorreu apenas no século IX da Era Comum (EC) como alternativa ao *gruit*, mistura de ervas utilizada antes do lúpulo (HORNESEY, 2003). O lúpulo apresenta três grupos de compostos essenciais à cerveja: (i) resinas, (ii) óleos essenciais e (iii) polifenóis. As resinas são subdivididas em macias e duras, com destaque para as macias que contém α - e β -ácidos. Desses, os principais são os α -ácidos (humulona, cohumulona e adhumulona), compostos que são isomerizados durante a fervura em iso-humulona, iso-cohumulona e iso-adhumulona, compondo a maior parcela do amargor da cerveja. Os óleos essenciais compõem a porção volátil do lúpulo e são divididos em hidrocarbonetos, compostos oxigenados e sulfurados. Por serem facilmente volatizados, sua principal função na cerveja é fornecer aroma e sabor que podem remeter a notas cítricas, florais, resinosas, frutadas, terrosas, entre outras. Estima-se que exista aproximadamente 1000 óleos essenciais no lúpulo, sendo que desses, mais ou menos 440 já foram descritos. Os polifenóis, por sua vez, são importantes para a estabilidade coloidal da cerveja, uma vez que se ligam a proteínas em baixas temperaturas, formando a turvação a frio (*chill haze*) (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Por fim, as leveduras são os agentes responsáveis pela fermentação cervejeira e pelo fato de serem organismos microscópicos unicelulares, sua origem era desconhecida até o século XVIII EC (BOULTON & QUAIN, 2001). Nesse sentido, as informações sobre leveduras e as suas características que as tornam únicas para a fabricação de cervejeira serão aprofundadas no item 1.3.

Resumidamente, a fabricação de cervejas subdivide-se, em duas principais etapas: fase quente, onde ocorre a produção de mosto (brasagem) e fria, etapa de fermentação do mosto e posterior maturação (Figura 1). A fabricação de mosto (solução aquosa composta majoritariamente por açúcares simples extraídos do malte) tem seu início na etapa da mosturação. Durante esse passo, que se dá pela mistura de água quente (aproximadamente 65 °C) e malte moído, ocorre a degradação de proteínas pela ação das proteases e de amido pelas enzimas desenvolvidas durante a malteação, em especial α -amilase e β -amilase, resultando em carboidratos fermentescíveis como glicose, maltose e maltotriose e não fermentescíveis, denominados dextrinas. Posteriormente, no processo de clarificação, essa mistura de grãos e água é recirculada por meio da utilização de uma bomba, e o mosto filtrado é então fervido, momento onde ocorre a adição do lúpulo. Após a fervura, o mosto é resfriado e separado do aglomerado de proteínas coaguladas (*trub*) e ocorre a oxigenação do mosto, assim como o inóculo de leveduras. Durante a

fermentação, os açúcares dissolvidos no mosto são metabolizados a etanol, gás carbônico e compostos aromáticos, diminuindo a densidade até o momento onde ela é estabilizada. A partir desse momento, inicia-se a maturação, processo que ocorre a baixas temperaturas e é responsável pela estabilidade coloidal e aprimoramento das características organolépticas da cerveja (KUNZE, 2014).

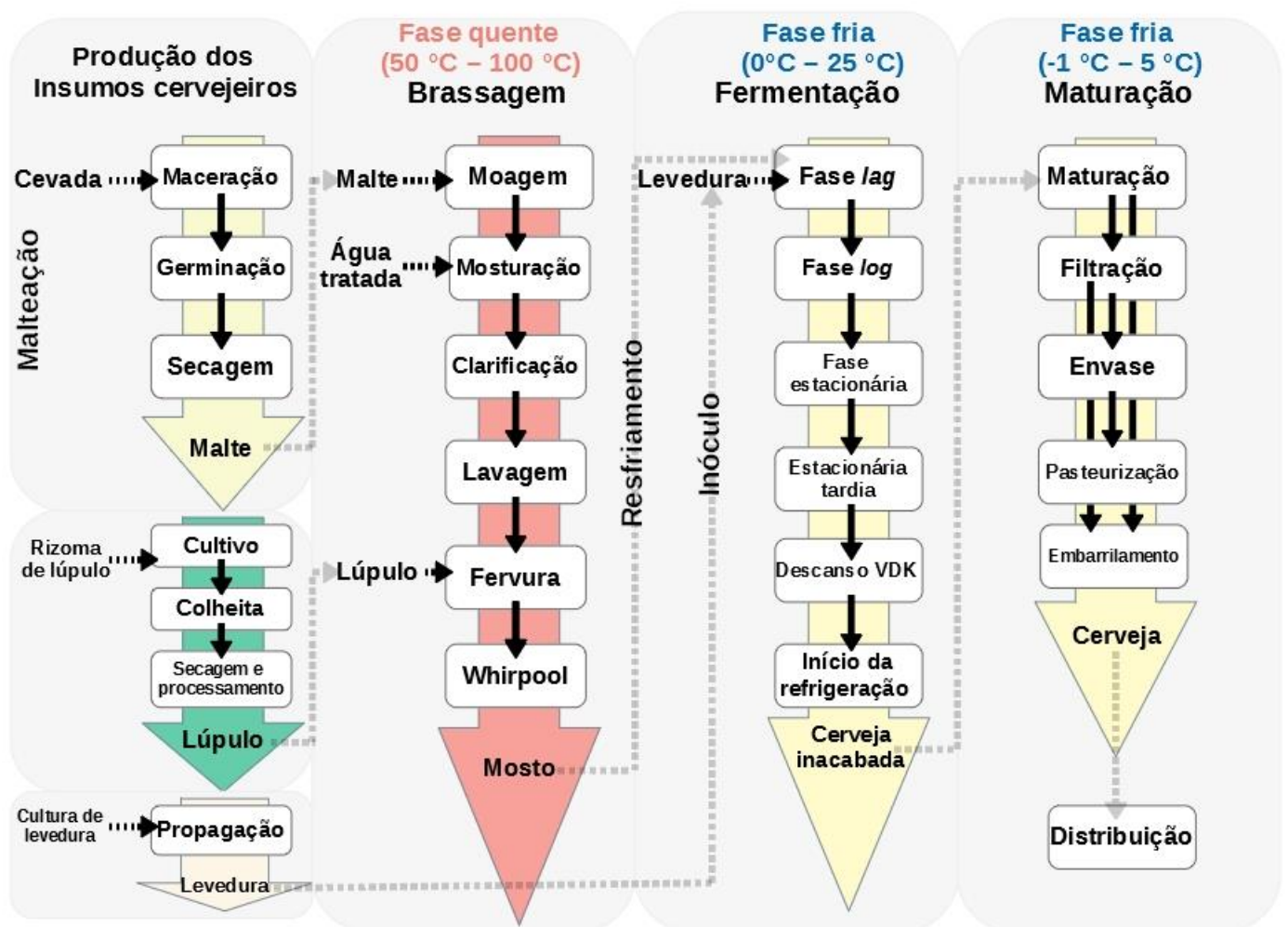


Figura 1. Fluxograma do processo convencional de fabricação cervejeira.

1.3 Leveduras cervejeiras: cepas disponíveis e a busca por alternativas

A domesticação de leveduras cervejeiras está diretamente atrelada à atividade humana. Aparentemente, bateladas que agradavam ao cervejeiro e aos consumidores tinham suas leveduras reutilizadas e, por vezes, compartilhadas, ao passo que lotes desagradáveis resultaram no descarte do fermento. Esse processo de domesticação, que vem ocorrendo ao longo de milhares de anos, está, também, intimamente associado ao fato de que fermentações espontâneas são geralmente demoradas, inconsistentes e ineficientes, resultando em produtos fermentados incompletos (muitos açúcares remanescentes após a fermentação, tornando a cerveja excessivamente doce), com aromas indesejáveis (os denominados *off-flavours*, que podem remeter a aromas como vômito, no caso do ácido isobutírico). Cabe ressaltar que existem cervejarias (como aquelas que produzem, por exemplo, *lambics* e *gueuzes*) que aprimoraram esse método de fermentação com leveduras e bactérias selvagens e continuam executando-o até os dias atuais. (BOKULICH *et al.*, 2012; STEENSELS & VERSTREPEN, 2014; GALLONE *et al.*, 2016). Nesse sentido, em geral, parece haver existido uma preferência na seleção de traços fenotípicos específicos para a fabricação cervejeira, favorecendo aquelas leveduras que: (i) apresentavam altas taxas de atenuação, ou seja, elevada capacidade de assimilação e fermentação de carboidratos simples (como os monossacarídeos glicose e frutose e dissacarídeos como a sacarose e maltose) e complexos (como o trissacarídeo maltotriose e, em alguns casos, dextrinas, como maltotetraose e moléculas com mais de 4 monômeros de glicose) em decorrência da duplicação dos genes *MAL*, (ii) ausência na formação de compostos fenólicos, em especial 4-vinilguaiacol, devido a mutações nos genes *PADI* e *FDCI* (há exceções à regra onde estilos de cerveja requerem esses compostos, como cervejas de trigo do estilo Weiss e Witbier, por exemplo) e (iii) capacidade de flocular, que favorece o agrupamento das leveduras, clarificando naturalmente a cerveja e facilitando a retirada da biomassa de fermento para posterior utilização (MCMURROUGH *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 2010; STEENSELS & VERSTREPEN, 2014; GALLONE *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Sabe-se que as atuais cepas de leveduras cervejeiras disponíveis para indústria originaram-se de inúmeras cepas ancestrais, formando os seguintes clados: *Beer 1*, que contém a maioria das leveduras provenientes da Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos e *Beer 2*, que contém cepas relacionadas às leveduras viníferas e não apresentam uma estrutura geográfica bem definida (GALLONE *et al.*, 2016).

Atualmente, figuram como principais leveduras disponíveis para o mercado cervejeiro, as cepas pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*. *S. cerevisiae* é a levedura utilizada para fermentar as cervejas de alta fermentação, ou *ales*. Por outro lado, *S. pastorianus*, é responsável pela fermentação de cervejas de baixa fermentação, ou *lagers*. As cepas que pertencem à família *ale* contém maior número de exemplares, assim como uma maior diversidade de traços fenotípicos como formação de ésteres, compostos fenólicos e sulfurados, cepas com alta e baixa taxa de atenuação, ácidos orgânicos, álcoois superiores, entre outros (WHITE & ZAINASHEFF, 2010). Embora também existem inúmeras cepas de leveduras *lager*, estas apresentam menos cepas popularizadas para utilização na fabricação de cervejas, assim como menos traços fenotípicos descritos e observados. Suas principais representantes estão presentes nos dois principais grupos de *S. pastorianus*: *Saaz* e *Frohberg*. Em contrapartida, é a levedura mais usada atualmente (90% da produção mundial de cervejas utiliza essa espécie como agente fermentativo), uma vez que é responsável pela fermentação das cervejas de massa, mais conhecidas como *Pilsen* ou *Standard Lite Lager*. Além das cervejas massificadas, *S. pastorianus* também é empregada na fermentação de cervejas artesanais, englobando uma série de estilos, como, por exemplo, Bock e Baltic Porter (WHITE & ZAINASHEFF, 2010).

Embora, juntas, *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* apresentem uma ampla variedade de cepas atualmente disponíveis para o mercado cervejeiro, existe a demanda por microrganismos que apresentem características distintas das presentes nessas variedades, visando o desenvolvimento de novas cervejas (KROGERUS *et al.*, 2015; KROGERUS, 2017). Aplica-se a essa prospecção o recente uso de microrganismos semi-domesticados ou selvagens (não convencionais), como as espécies pertencentes ao gênero *Brettanomyces* (*Dekkera*) (vide apêndice): *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. nanus* e *B. naardenensis*, além de *Torulaspora delbrueckii*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxi*, *Pichia kluyverii*, entre outros (MICHEL *et al.*, 2016).

Por outro lado, a construção de novas cepas em laboratório também é uma alternativa para a geração de leveduras diferenciadas para a indústria. Nesse sentido, existem distintas técnicas moleculares, as quais incluem a geração de organismos geneticamente modificados (OGM) (DONALIES *et al.*, 2008). Entretanto, a legislação não permite a utilização de tais organismos na indústria cervejeira, além disso, outro fator

impeditivo do uso de organismos OGM é a baixa aceitação do público (SAERENS, DUONG & NEVOIGT, 2010). Assim sendo, técnicas capazes de gerar cepas que não envolvam engenharia genética tem se mostrado valiosas no que diz respeito à geração de novas alternativas de leveduras cervejeiras, assim como aceitação e utilização por parte das indústrias e do consumidor. Nesse sentido, destacam-se os métodos de hibridização interespecífica por formação de esporos e hibridização rara (KROGERUS *et al.*, 2017).

1.4 Surgimento de híbridos na natureza e aplicação em laboratório

Os estudos recentes demonstraram que algumas cepas cervejeiras agrupadas nas espécies *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* são, ao contrário do que se pensava, híbridos interespecíficos. O exemplo mais significativo reside na descoberta de que os dois grupos de *S. pastorianus*, *Saaz* e *Frohberg*, são híbridos compostos por *S. eubayanus* e *S. cerevisiae* (KROGERUS *et al.*, 2015). Além disso, cepas incluídas na espécie *S. cerevisiae*, como aquelas responsáveis pelas fermentações de cervejas de abadia ou trapistas são, na verdade, híbridos de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

O surgimento e estabelecimento de híbridos no ambiente cervejeiro provavelmente ocorre devido a vantagens adaptativas dos híbridos quando comparados aos seus progenitores. Nesse sentido, a criotolerância de *S. eubayanus* e a capacidade de metabolizar açúcares complexos, como a maltotriose de *S. cerevisiae*, possivelmente conferiram a *S. pastorianus* benefícios nos ambientes fermentativos que deram origem às cervejas *lager* (KROGERUS *et al.*, 2015). Da mesma maneira, *S. kudriavzevii* parece ter incorporado aos híbridos de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* o recurso de metabolismo a baixas temperaturas, importante para a fermentação em regiões temperadas da Europa (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

A descoberta da origem de algumas cepas como sendo híbridas gerou subsídios para recriação dessas espécies em laboratório, tornando-se uma importante ferramenta biotecnológica na construção de cepas cervejeiras alternativas e não-GMO (KROGERUS *et al.*, 2017). Além disso, auxiliou na compreensão das complexas origens evolutivas de diferentes espécies cervejeiras, caso das leveduras *lager*. Nesse ponto de vista, pesquisadores geraram novas cepas de *S. pastorianus* com características de rápida fermentação, alta atenuação, produção de aromas frutados complexos e agradáveis, além de tolerância aos diferentes estresses impostos no ambiente cervejeiro, que apresentaram

performances melhores que as cepas empregadas atualmente na indústria (MERTENS *et al.*, 2015).

Uma vez estabelecidos os métodos de hibridização interespecíficas em laboratório, tornou-se possível extrapolar para outras cepas e espécies de leveduras, visando a aplicação na indústria cervejeira. Dessa forma, foram testadas hibridizações a partir de diversas cepas parentais, como *S. cerevisiae* (*ale*) x *S. cerevisiae* (*sake*), *S. cerevisiae* (*ale*) x *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, *S. cerevisiae* (*ale*) x *S. bayanus* (criotolerante), *S. cerevisiae* (*ale*) x *S. cerevisiae* (vinífera) x *S. eubayanus*, entre outros (KROGERUS, 2017). O resultado desses cruzamentos foi a geração de inúmeros híbridos com recursos fermentativos de interesse industrial, como a maior formação de compostos aromáticos (ésteres, fenólicos, ácidos orgânicos e álcoois superiores), alta floculação, alta taxa de atenuação, termotolerância e capacidade de lidar com ambientes indutores de estresse (baixos pHs e altas concentrações etanol, por exemplo) (KROGERUS, 2017).

1.5 Cervejas de fazenda norueguesas (*Norwegian farmhouse ales*) e suas leveduras (Kveiks)

Embora a domesticação de leveduras cervejeiras tenha sido encorajada e efetuada mais rapidamente devido à produção massificada de cervejas, a cultura de compartilhamento de biomassa de leveduras também era uma prática comum desde antes da industrialização, especialmente no que diz respeito às *Farmhouse Ales*, mais conhecidas na região norte da Bélgica, com o estilo *Saison* e também presentes na região da Noruega, compondo as fermentações das *Norwegian farmhouse ales* (como as representantes *maltøl*, *kornøl* e *vossaøl*) (NORDLAND, 1969; MARKOWSKI, 2004; PREISS *et al.*, 2018). A produção de *farmhouse ales* perdeu força a partir do século XIX em decorrência de melhorias no transporte e especialização econômica. Com isso, as leveduras Kveiks utilizadas para a produção das *Norwegian farmhouse ales* foram parcialmente substituídas por aquelas comercializadas, fazendo com que muitas linhagens dessas leveduras desaparecessem (NORDLAND, 1969). Em contrapartida, muitas cervejarias da região oeste da Noruega mantiveram a tradição de produção de *farmhouse ales* com as leveduras Kveiks.

As *Norwegian farmhouse ales* tem despertado interesse da indústria cervejeira devido à biodiversidade de leveduras empregada em suas fermentações e às particularidades do processo de fabricação de mosto (como a utilização de zimbro, por

exemplo) e inóculo das leveduras e fermentações a altas temperaturas (caracteristicamente de 28 °C a 40 °C), apresentando variações significativas (Figura 2) em relação a outras escolas cervejeiras, que empregam os métodos descritos acima (GARSHOL & PREISS, 2018). Embora pouco se conheça sobre as leveduras Kveiks, uma pesquisa recente utilizou as ferramentas de biologia molecular PCR interdelta com os primers $\delta 12/21$ e $\delta 2/12$ e posterior *fingerprinting*, além de sequenciamento de DNA dos seus principais representantes e caracterização fenotípica das cepas em mosto cervejeiro. Os dados dessa pesquisa indicam que Kveiks (i) apresentam traços de domesticação, (ii) são um grupo geneticamente inter-relacionado, (iii) formam um grupo filogeneticamente distinto das demais leveduras cervejeiras (Figura 3), com espécies que incluem *S. cerevisiae* e um híbrido interespecífico (*S. cerevisiae/eubayanus/uvarum*), (iv) contém características positivas do ponto de vista de biossíntese de compostos aromáticos e de sabor como ésteres e (v) apresentam tolerância aos diversos estresses fermentativos (como o térmico, demonstrando crescimento até 43 °C e o etanólico, com desenvolvimento em ambientes com até 16 % (v/v) de etanol). Essas características as tornam potenciais leveduras para uma gama de aplicações industriais, como as indústrias vinícola, a de destilados e, em especial, a cervejeira (NORDLAND, 1969; RASMUSSEN, 2016; PREISS *et al.*, 2018).

Em relação às características moleculares, a pesquisa de Preiss *et. al* demonstrou que as diferentes cepas sequenciadas (representantes de 6 grupos de Kveiks) são tetraploides, onde 4/6 apresentam aneuploidias e 3/6, uma cópia adicional do cromossomo IX. Ainda, as Kveiks apresentam altos níveis de heterozigosidade, com números de SNPs que variam de ~54.000 a 68.000. Além disso, apresentam viabilidade de esporos acima de 40 % para a maioria de suas representantes que tiverem o DNA sequenciado, como Granvin 1, Hornindal 1, Hornindal 2, Laerdal 2 e Voss 1, à exceção de Stordal Ebbegarden 1, que apresentou 6,9 % de viabilidade de esporos (PREISS *et al.*, 2018). Mutações pontuais (SNPs) nos genes *PADI* e *FDCI* também foram demonstrados nas seis cepas sequenciadas, o que explica a perda de função das enzimas codificadas por esses genes (cinamato descarboxilase) e que é responsável pela formação do composto fenólico 4-vinilguaiacol. Amplificações no *loci MAL3x* (*MAL31* permease, *MAL32* maltase, os fatores de transcrição *MAL33* e *YPR195W*), explicam, por sua vez, a capacidade das Kveiks fermentarem os açúcares maltose e maltotriose, atenuando o mosto cervejeiro até valores próximos de 90 %.

Culturalmente, as leveduras Kveiks são armazenadas em anéis de madeira (anéis de Kveik) que são embebidos em cerveja durante a fermentação e posteriormente secos sendo, portanto, usados para estocá-las por períodos de até um ano (NORDLAND, 1969; RASMUSSEN, 2016). Cabe ressaltar que as culturas de Kveiks são normalmente uma mistura de mais de uma cepa. Isso implica que muitas características de cepas diferentes podem ser combinadas ao longo do processo de fermentação, por exemplo, cepas que apresentam baixa floculação podem ser “compensadas” por aquelas altamente floculantes (PREISS *et al.*, 2018). As fermentações caracterizam-se por serem rápidas (24-48 horas) mesmo com densidades originais altas ($\sim 1,080 \text{ kg/cm}^3/19,25 \text{ }^\circ\text{P}$), gerarem compostos aromáticos agradáveis, sobretudo ésteres frutados, como acetato de etila, propil acetato e decanoato de etila, apresentarem altas taxas de atenuação e um espectro de floculação de baixa a elevada (GARSHOL, 2014; GARSHOL, 2015; GARSHOL, 2016; RASMUSSEN, 2016; PREISS *et al.*, 2018). Entre as espécies identificadas e isoladas nos anéis de Kveik destacam-se as cepas de *S. cerevisiae*, que vem sendo utilizadas, especialmente, por microcervejarias e cervejeiros caseiros (GARSHOL & PREISS, 2018).

Os recursos apresentados por cepas de *S. cerevisiae* como *Sigmund's Voss* Kveik (The Yeast Bay), isolada a partir da *farmhouse ales* produzidas na cidade de Gjernes, na região oeste da Noruega, incluem fermentações rápidas, altas taxas de atenuação (78-83%), notas terrosas e de especiarias, acidez acentuada e perfil esterificado único que remete a laranja. No que diz respeito à floculação, dependendo das condições (pH, densidade, temperatura do mosto e número de células) essa cepa é capaz de formar grandes flocos, notavelmente maiores que outras cepas cervejeiras de *S. cerevisiae*, e assim mesmo, mantém altas capacidades atenuativas, diferente do que costuma-se observar em variedades altamente floculantes. Além disso apresenta uma extensa faixa de temperaturas de fermentação ($20 \text{ }^\circ\text{C} - 38 \text{ }^\circ\text{C}$) sem que altere drasticamente o perfil sensorial da cerveja, ou seja, não forma compostos desagradáveis como álcoois superiores, como o isobutanol, e compostos fenólicos, como o 4-vinilguaiacol, favorecendo-se de temperaturas mais altas, uma vez que resulta em maiores taxas de atenuação e formação de ésteres (acessado em <http://www.theyeastbay.com/brewers-yeast-products/sigmunds-voss-kveik>).

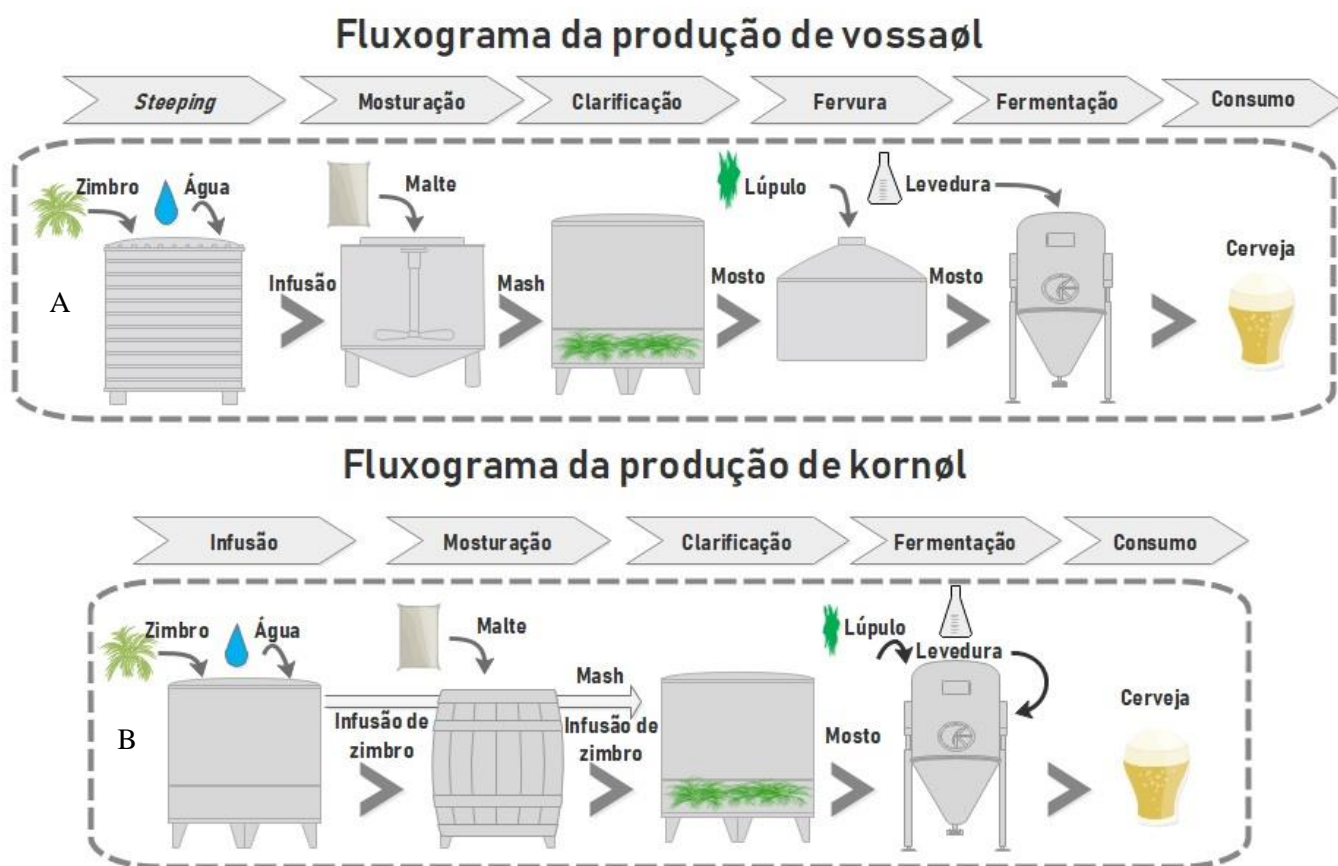


Figura 2. Fluxograma do processo de produção das *Norwegian farmhouse ales* (A. vossaøl e B. kornøl), exemplificando diferenças fundamentais em comparação com o processo tradicional de fabricação cervejeira.

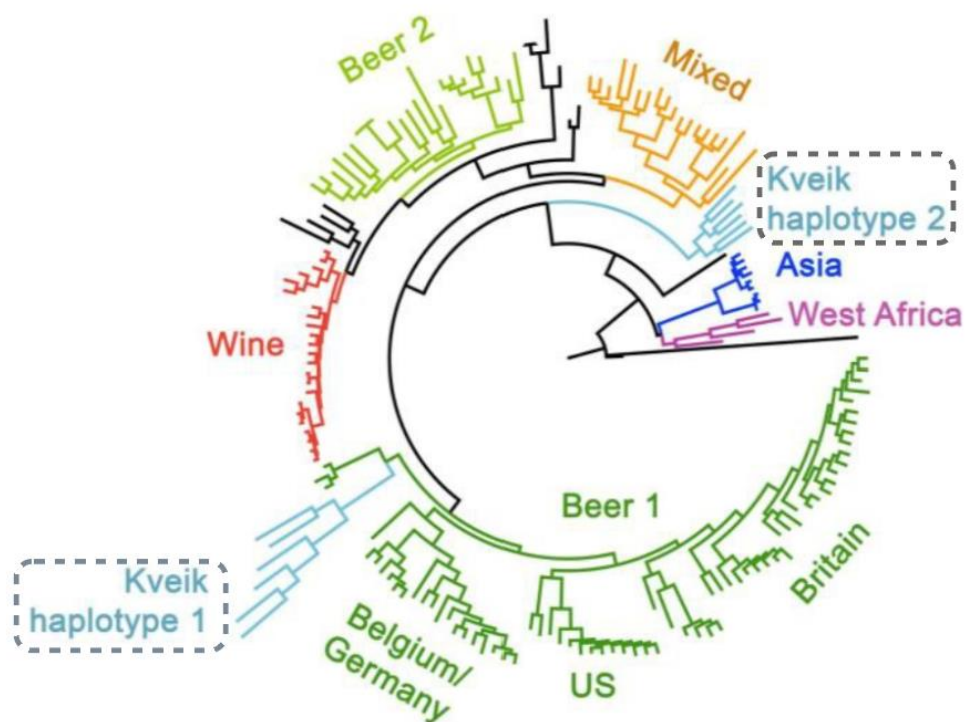


Figura 3. Dendograma simplificado demonstrando a posição das leveduras Kveiks em perspectiva com as outras leveduras cervejeiras domesticadas. Imagem adaptada de GARSHOL, L. M. & PREISS, R. How to brew with Kveik. *Master Brewers Association of the Americas*, 55 (4): 76-83, 2018.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Gerar novas cepas híbridas cervejeiras entre *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de *Norwegian farmhouse ales* (Kveik) e *Saccharomyces kudriavzevii*.

2.2 Objetivos específicos

1. Gerar cepas híbridas de *S. cerevisiae* (Kveik) e *S. kudriavzevii* pelo método de hibridização rara.
2. Confirmar a ocorrência das hibridizações pelos métodos de análises fenotípicas por crescimento em meio mínimo e com o uso de ferramentas de biologia molecular, tais como PCR, RFLP e sequenciamento da região ITS1/ITS2.
3. Avaliar a formação de compostos aromáticos e capacidade atenuativa dos híbridos em mosto cervejeiro lupulado de pequena escala.

3. Resultados

Farmhouse ale yeast strains from Belgium and Norway as chassis for interspecific hybridizations

Artigo em fase inicial de redação

Farmhouse ale yeast strains from Belgium and Norway as chassis for interspecific hybridizations

Bianca de Paula Telini**, Marcelo Menoncin** and Diego Bonatto*

Brewing Yeast Research Group, Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Short title: Hybrids and Farmhouse ales

***Corresponding author:**

Diego Bonatto

Centro de Biotecnologia da UFRGS - Sala 107

Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Avenida Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421

Caixa Postal 15005

Porto Alegre – Rio Grande do Sul

BRAZIL

91509-900

Phone: (+55 51) 3308-7765

E-mail: diegobonatto@gmail.com

Contract/grant sponsor: CNPq

**Both authors contributed equally to the study

4. Discussão geral

A domesticação de leveduras, ocorrida pelo processo de seleção artificial, gerou uma considerável diversidade genotípica e fenotípica. Nesse sentido, atualmente, existem inúmeras leveduras cervejeiras distintas disponíveis para utilização em cervejarias, das quais se destacam as cepas da espécie *S. cerevisiae* (ales), como, por exemplo, as recém popularizadas Kveiks e *S. pastorianus* (lagers) (GALLONE *et al.*, 2016; PREISS *et al.*, 2018). Ainda que exista um número abundante de cepas de leveduras cervejeiras, há uma crescente demanda por cepas alternativas que representam a possibilidade de (i) gerar novos produtos em decorrência de atributos fermentativos como a formação de compostos aromáticos como ésteres, fenóis e ácidos orgânicos e (ii) economia por meio da otimização das plantas fabris ao utilizar leveduras que apresentam uma velocidade de fermentação mais eficiente (KROGERUS, 2017).

É importante ressaltar, também, que muitas cepas cervejeiras são, na realidade, híbridos interespecíficos (~ 25 %), e que, ao reconstruir esses híbridos em laboratório, há uma melhor compreensão das origens evolutivas dessas cepas, assim como a possibilidade da geração de novos híbridos com características únicas (KROGERUS, 2017; GALLONE *et al.*, 2019 & LANGDON *et al.*, 2019).

A partir da lógica de criação de novos híbridos interespecíficos em laboratório com potencial aplicação na indústria cervejeira, conforme discutido no capítulo 1, foram construídos cinquenta possíveis híbridos entre a cepa de *S. cerevisiae* Voss Kveik e a cepa-tipo de *S. kudriavzevii* (NCYC2889) por meio do método de hibridização rara. Dessa totalidade, confirmou-se dez híbridos por ferramentas de biologia molecular como PCR/RFLP e sequenciamento da região ITS. Desses, três híbridos foram escolhidos para posterior caracterização em mosto cervejeiro.

Os híbridos selecionados (KKH1-KKH3) demonstraram uma boa performance fermentativa, alcançando valores de atenuação similares à cepa parental de *S. cerevisiae* Voss Kveik, mas em menos tempo, o que pode representar que ao utilizá-los em cervejarias, os tanques de fermentação podem se otimizados, com maior produção de volume de cerveja (KROGERUS, 2017). Os resultados de atenuação aparente (~86 %) tornam as cepas híbridas estudadas distintas pois esses altos valores ocorreram em uma notável amplitude de temperatura de fermentação (17 °C - 35°C), o que é incomum para a maioria das cepas cervejeiras, uma vez que usualmente existe uma faixa de temperatura

mais restrita para que se alcancem os valores máximos de atenuação. Essa característica é importante pois indica que pode não ser necessário o controle de temperatura de fermentação, o que representa uma notável redução de custos para as cervejarias (WHITE & ZAINASHEFF, 2010; KROGERUS, 2017).

Os híbridos apresentaram produção acima do limiar de percepção de uma gama de ésteres na temperatura testada (25 °C), que não foram produzidos pelas cepas parentais, como pentanoato de etila (que remete à maçã vermelha e melão), hexanoato de etila (maçã e anis-estrelado), cinamato de etila (frutado) e fenetil acetato (doce, mel e floral), além de decanoato de etila (brandy, frutado e uva), gerado, também, pelas cepas parentais. Os ésteres compreendem o grupo de compostos aromáticos mais importantes gerados durante a fermentação de cervejas (PIRES *et al.*, 2014). Assim, as leveduras híbridas geradas nesse trabalho diferenciam-se pela variedade de ésteres produzidos, o que pode representar um importante recurso para a indústria cervejeira. Ainda, os dados obtidos a partir da medição de pH pós-fermentação sugerem que KKH1-KKH3 têm, potencialmente, uma alta produção de ácidos orgânicos, o que sugere que essas cepas podem ser empregadas na produção de cervejas levemente ácidas. Conforme discutido no capítulo 1, o mercado de cervejas ácidas vem crescendo e, portanto, a demanda por leveduras que acidificam o mosto naturalmente, também. Desse modo, nossos dados sugerem que leveduras alternativas que atenuem mais que, por exemplo, *Lachancea thermotolerans* (produtora de altas concentrações de ácido láctico, porém com baixa atenuação), podem ser geradas a partir da hibridização de cepas de kveiks, como a Voss Kveik e *S. kudriavzevii*.

Ainda é necessário caracterizar uma série de traços genotípicos e fenotípicos das cepas híbridas geradas, como (i) a herança de DNA mitocondrial, importante para o crescimento de leveduras híbridas em baixas temperaturas, (ii) a biossíntese de compostos de aroma e sabor como álcoois superiores e compostos fenólicos, (iii) a capacidade de floculação, fermentação de açúcares complexos como as dextinas e (iv) a tolerância aos diversos estresses presentes na fermentação cervejeira. No entanto, os dados obtidos até o momento de taxas de atenuação, produção de ésteres e pH pós-fermentação indicam que as cepas híbridas KKH1-KKH3 são promissoras para aplicação na indústria cervejeira, assim como a cepa Voss Kveik apresenta potencial para a geração de novos híbridos interespecíficos.

5. Conclusão geral

A hibridização interespecífica em laboratório vem ganhando força e se reafirma cada vez mais como uma ferramenta valiosa no que diz respeito à construção de cepas alternativas de leveduras cervejeiras e com possível aplicação na indústria. Nesse sentido, o presente trabalho visa ampliar o conhecimento acerca de híbridos interespecíficos na indústria cervejeira no que diz respeito à escolha de diferentes cepas, métodos de hibridização, confirmação e caracterização dos híbridos gerados. A partir dos dados obtidos nessa pesquisa, é possível inferir híbridos entre *S. cerevisiae* de diferentes origens e ainda pouco conhecidos, como a cepa Voss Kveik, pertencente a um grupo filogeneticamente distinto de cepas cervejeiras estudadas até o momento (Kveiks) e *S. kudriavzevii* podem ser gerados por meio dos métodos descritos acima. Além disso, é possível inferir que a cepa Voss Kveik da espécie *S. cerevisiae* pode servir como chassi para a formação de híbridos interespecíficos que contenham características fermentativas distintas das cepas atualmente disponíveis e que coincidam com as demandas atuais da indústria cervejeira.

6. Conclusões específicas

- As cepas Voss Kveik (*S. cerevisiae*) e NCYC2889 (*S. kudriavzevii*) podem servir como chassis para a formação de híbridos interespecíficos pelo método de hibridização rara a partir da geração de mutantes auxotróficos para *Lis-* e *Ura-*.
- Três híbridos selecionados para caracterização (KKH1-KKH3) demonstraram performance que superou as cepas parentais nas temperaturas de 25°C e 35 °C no tempo para alcançar a densidade específica final, enquanto um dos híbridos (KKH1) foi mais rápido que a cepa parental na temperatura de 17 °C.
- KKH1-KKH3 demonstraram produção de mais ésteres acima do limiar de percepção que as cepas parentais.
- Os valores de pH finais após a fermentação indicam que KKH1-KKH3 podem ter potencial para a aplicação na indústria de cervejas ácidas. Devido às suas características fermentativas, os híbridos gerados nesse trabalho apresentam potencial para aplicação nas indústrias vinícola e, especialmente, a cervejeira.

7. Perspectivas

- Determinar qual é a herança parental do DNA mitocondrial, que está diretamente relacionado à criotolerância de leveduras híbridas.
- Avaliar traços fenotípicos como (i) a expressão dos genes *ATF1* e *ATF2* de modo a compreender sua contribuição para a formação dos ésteres observados nessa pesquisa, (ii) a expressão e sequenciamento os genes *PADI* e *FDC1* para verificar se há biossíntese de compostos fenólicos como o 4-vinilguiacol, assim como quantificar essa molécula por meio da utilização de GC-FID, (iii) capacidade de floculação dos híbridos gerados, observando, também, a expressão dos genes *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11*, além de executar uma análise espectrofotométrica.
- Avaliar precisamente a assimilação e fermentação dos carboidratos glicose, frutose, maltose, maltotriose e dextrinas por meio da técnica de HPLC.
- Verificar se há a presença do gene *STAI*, de modo a averiguar se a capacidade atenuativa dos híbridos está relacionada com a expressão da enzima glicoamilase, que permite a fermentação de dextrinas.
- Avaliar a tolerância a diferentes estresses fermentativos, como térmico, etanólico, oxidativo, de pH, osmótico e depleção de nutrientes.
- Realizar o sequenciamento do genoma das leveduras híbridas e determinar sua ploidia, visando compreender os aspectos genômicos associados às cepas estudadas.

8. Referências complementares

1. ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E.; K. & BECKER, T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4): 289-314, 2014.
2. BARTH-HASS. The Barth Report. HOPS 2016/2017. Germain Hansmaennel. 2016. Disponível em: <http://www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/downloads/pdfs/412/barthbericht20162017en.pdf>. Acesso em: 19/08/2017.
3. BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W.; MILLS, D. A. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS ONE*, 7(4): e35507, 2012.
4. BOULTON & QUAIN. *Brewing yeast & fermentation*. Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing company, 2001.
5. BROWN, C. A.; MURRAY, A. W.; & VERSTREPEN, K. J. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Current Biology* 20, 895–903, 2010.
6. CERVBRASIL - Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário, 2016. Disponível: http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBrasilAnuario2016_WEB.pdf. Acesso em: 19/08/2017.
7. DONALIES U. E.; NGUYEN H. T. T.; STAHL, U & NEVOIGT, E;. Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111:67–98, 2008.
8. GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T.; SORIAGA, L.; SAELS, V.; HERRERA-MALAYER, B.; *et al.* Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, 166(6): 1397- 1410, 2016.
9. GALLONE, B; STEENSELS, J.; MERTENS, S.; DZIALO, M. C.; GORDON, J. L.; WAUTERS, R.; *et al.* Interspecific hybridization facilitates niche adaptation in beer yeast. *Nature Ecology & Evolution*, 3: 1562-1575, 2019.
10. GARSHOL, L. M. Analysis of farmhouse yeast (kveik). Larsblog. 2016. Disponível online em: <http://www.garshol.priv.no/blog/349.html>.
11. GARSHOL, L. M. Brewing Raw Ale in Hornidal. Larsblog. 2015. Disponível online em: <http://www.garshol.priv.no/blog/342.html>.
12. GARSHOL, L. M. (2014). Brewing with Kveik. Disponível online em:

<http://www.garshol.priv.no/blog/291.html>.

13. GARSHOL, L. M. & PREISS, R. How to brew with Kveik. *Master Brewers Association of the Americas*, 55 (4): 76-83, 2018.
14. GONÇALVES, M.; PONTES, A.; ALMEIDA, P.; BARBOSA, R.; SERRA, M., LIBKIND, D., *et al.* Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. *Current Biology*, 26, 2750–2761, 2016.
15. GONZÁLEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Applied and environmental microbiology*, 74(8): 2314–2320, 2008.
16. HORNESEY, I. S. A History of Beer and Brewing. RSC paperbacks: Cambridge, 2003.
17. JOFFE, A. H. Alcohol and social complexity in ancient western Asia. *Current Anthropology* 39, 297–322, 1998.
18. KROGERUS, K.; LAAKSO, T. S.; CASTILLO, S. & GIBSON, B. Inheritance of brewing relevant phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Microbial Cell Factories*, 16: 66, 2017.
19. KROGERUS, K.; MAGALHÃES, F.; VIDGREN, V. & GIBSON, B. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42:769–78, 2015.
20. KROGERUS, K.; MAGALHÃES, F.; VIDGREN, V. & GIBSON, B. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101: 65–78, 2017.
21. KUNZE, W. Technology Brewing & Malting. VLB, Berlin, 2014.
22. LANGDON, Q. K.; PERIS, D.; BAKER, E. P.; OPULENTE, D. A.; NGUYEN, H-V.; BOND, U. *et al.* Fermentation innovation through complex hybridization of wild and domesticated yeasts. *Nature Ecology & Evolution*, 3: 1576-1586, 2019.
23. MARCUSO, E. F. & MULLER, C. V. A CERVEJA NO BRASIL: O ministério da agricultura informando e esclarecendo, 2018.
24. MARKOWSKI, P. Farmhouse Ales: Culture and Craftsmanship in the Belgian Tradition. Brewers Publications, Boulder, 2004.
25. MCMURROUGH, I.; MADIGAN, D.; DONNELLY, D.; HURLEY, J.; DOYLE, A-M.; HENNIGAN, G. & MCNULTY, N. Control of ferulic acid and 4-vinyl guaiacol in brewing. *Journal of Institute of Brewing*, 102: 327–332, 1996.

26. MERTENS, S.; STEENSELS, J.; SAELS, V.; ROUCK, G. D. AERTS G. & VERSTREPEN, K. J. A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 8202–8214, 2015.
27. MICHEL, M.; MEIER-DÖRNBERG, T.; JACOB, F.; METHNER, F-J.; WAGNER, R. S. & HUTZLER, M. Review: Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing & Distilling*, 122(4): 569-587, 2016.
28. NORDLAND, O. *Brewing and Beer Traditions in Norway*. Oslo: The Norwegian Research Council for Science and the Humanities. 1969.
29. NORDLAND, O. *Brewing and beer traditions in Norway: The social anthropological background of the brewing industry*, Universitetsforlaget, 1969.
30. PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A. BRÁNYIK, T & VICENTE, A. A. Yeast: the soul of beer'saroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5): 1937-49, 2014.
31. PREISS, R.; TYRAWA, C.; KROGERUS, K; GARSHOL, L. M. & MERWE, G. V. D. M. Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-9, 2018.
32. RASMUSSEN T. C. Characterization of genotype and beer fermentation properties of norwegian farmhouse ale yeasts. Dissertação de mestrado, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, 2016.
33. SAERENS, S. M. G.; DUONG, C. T. & NEVOIGT, E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Applied Microbiolgy and Biotechnology*, 86: 1195–1212, 2010.
34. STEENSELS, J. & VERSTREPEN, K. J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68: 61–80, 2014.
35. UNGER R. W. *Beer in the Middle Ages and the Renaissance*. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, 2004.
36. WHITE C. & ZAINASHEFF J. *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Association: Brewers Publications, Boulder 2010.

9. Apêndice

Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing

*Artigo publicado no periódico Journal of the Institute of Brewing
and Distilling*

Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing

Marcelo Menoncin  and Diego Bonatto* 

Brettanomyces is a semi-domesticated yeast that is a crucial component of lambic beers and is increasingly attracting the attention of the brewing industry. *Brettanomyces* display *Saccharomyces*-like features, such as a positive Crabtree effect, ethanol synthesis and tolerance to harsh environments. Additionally, *Brettanomyces* exhibit β -glucosidase and esterase activities, the production of phenolic compounds and tetrahydropyridines, together with the ability to ferment dextrins and breakdown cellobiose from wooden casks. Although the importance of *Brettanomyces* species is documented in the production of different beer styles, the molecular and biochemical features of these species required for brewing are poorly understood. Therefore, this work reviews the current knowledge of the molecular biology and biochemistry underlying the performance of *Brettanomyces* in the brewing industry. © 2019 The Institute of Brewing & Distilling

Keywords: *Brettanomyces*; brewing; yeasts; fermentation; volatile compounds; stress tolerance

Introduction

Beer, one of the oldest biotechnological products, has significant nutritional, social, scientific and economic impact. Beer combines cereal malt, hops and/or different herbs, and water to create wort that is fermented by indigenous yeast/bacteria or, more typically, by pure cultures of *Saccharomyces* species. According to archaeological data, beer can be traced back to the first agricultural societies ~10,000 years ago, coinciding with cereal domestication (1). Currently, the consumption of the beer is generally increasing worldwide and the brewing industry is showing broad growth. Hence, scientific research in the brewing process and raw materials remains an important activity to support advances in knowledge and development.

Various yeast species were only discovered to be responsible for beer fermentation in the 1860's as a consequence of Louis Pasteur's work (2). Recognition of yeast and its domestication allowed better control of the fermentation process and an improvement in the quality of the final product, leading to the selection of a plethora of yeast strains used in brewing (3). These yeast strains include *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* and semi-domesticated unconventional species (4,5). A non-conventional brewing yeast genus that is attracting attention owing to its unusual features is *Brettanomyces* (6,7). Niels Hjelte Clausen first mentioned this genus in 1904 while searching the Carlsberg Brewery for an explanation for the peculiar characteristics of English stock ales (e.g. copious and lasting foam, acid and volatile substances) (8). *Brettanomyces* and its teleomorph form *Dekkera* are mainly associated with wine spoilage (9). *Brettanomyces* can also negatively affect beers as a contaminant during fermentation, conditioning and dispense of draught beer, producing compounds that are considered to be off-flavours (10,11). On the other hand, the positive contributions of *Brettanomyces* to flavour, aroma and attenuation are well recognised in Belgian beers such as lambic and gueuze (12,13). Additionally, this genus has an important role in the secondary conditioning of Trappist beer, English stock ales and American coolship ales (8,14,15).

Brettanomyces possess a high esterase activity, responsible for the biosynthesis of fruit-like esters (16). Additionally, *Brettanomyces* release flavour-active compounds in response to β -glucosidase activity, which degrades glycosides from hops or fruits to aglycones (e.g. linalool) (17). Moreover, *Brettanomyces* species produce volatile phenols such as 4-vinylguaiacol (clove flavour) and tetrahydropyridines (mousy/cracker biscuit-like flavour) (Figures 1 and 2) (18–23).

Although the importance of *Brettanomyces* species in wine, beer and bioethanol fermentation is acknowledged (9,24–26), the molecular and biochemical features of these species required for brewing are poorly understood. Thus, the aim of this work is to review the current knowledge of the molecular and biochemical pathways, as well as the biotechnological potential of these yeasts in the brewing industry, with a particular focus on aromatic compound biosynthesis.

Brettanomyces taxonomy

The name *Brettanomyces* is derived from the Greek meaning 'British fungus' (8). However, it was not the first name given to this genus, and it was included as a *Torula* species (27,28). Likewise, species belonging to the genus *Brettanomyces* have undergone many reclassifications over the years and its taxonomy remains poorly defined. Currently, the genus *Brettanomyces* includes six species recognised within the anamorphic (asexual) form and two species within the teleomorph (sexual) form. The anamorphic forms are *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*,

* Correspondence to: Diego Bonatto, Centro de Biotecnologia da UFRGS - Sala 107, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Avenida Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43421, Caixa Postal 15005 Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: diegobonatto@gmail.com

Brewing Yeast Research Group, Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

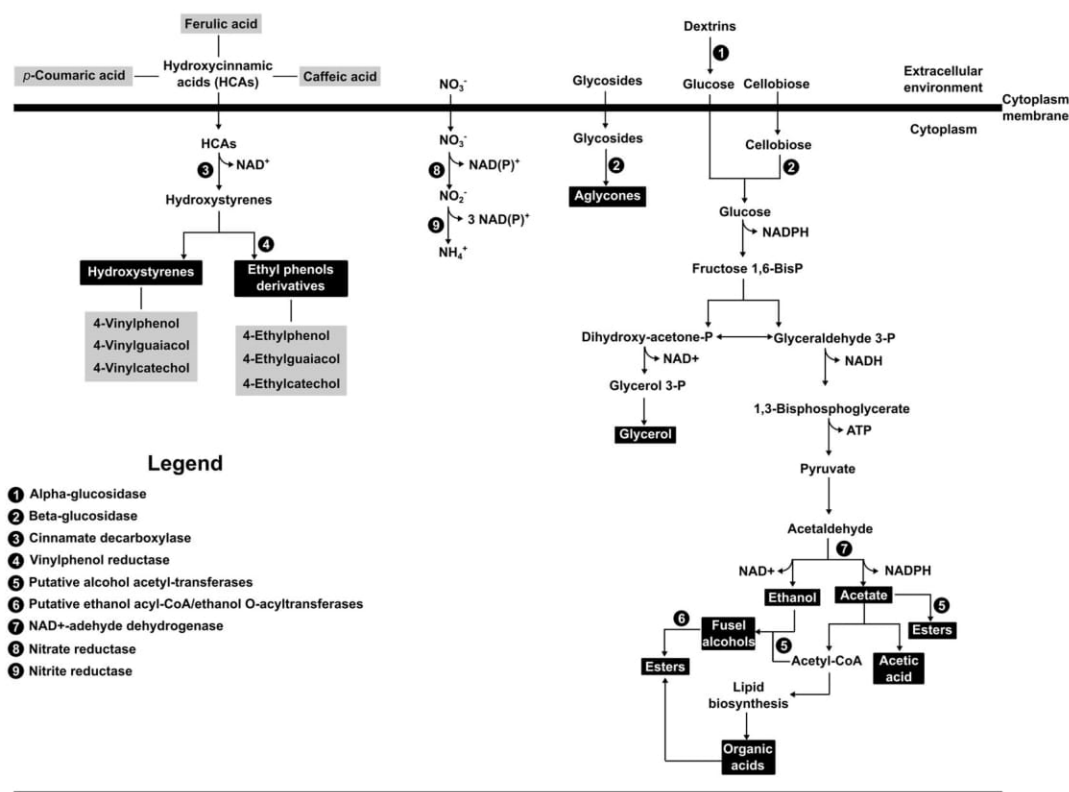


Figure 1. Schematic overview of the main metabolic pathways in *Brettanomyces* species during beer fermentation, focusing on the key enzymes linked to flavour active compound biosynthesis and the regulation of the redox balance (NAD^+/NADH) associated with the Custers effect. The flavour active compounds are indicated in the figure by grey and black boxes. The main enzymes responsible for the generation of flavour active compounds are indicated by black circles and by the inset legend in the figure.

B. naardenensis, *B. nanus* and the newly proposed species *B. acidodurans*. In turn, teleomorphic forms include *Dekkera bruxellensis* and *Dekkera anomala* (29–32). *Brettanomyces* and *Dekkera* are often used as synonyms but are described here as *Brettanomyces*.

Several biochemical and molecular features have been used to reconstruct *Brettanomyces* phylogeny. The data include cellular morphology, physiological comparisons (i.e. metabolism of different carbon sources), single nucleotide polymorphisms in the coenzyme Q gene, G+C content and DNA similarities (e.g. rDNA 26S), isoenzymes and type of conidiogenesis (29,33–36). Currently, next generation genome sequencing provides an easier and faster method for comparing species through an analysis of orthologous genes, thus facilitating distinctions among species (37,38).

Current phylogeny places this genus within the clade of the methylotropic species *Komagataella (Pichia) pastoris*, *Kuraishia capsulata* and *Ogataea polymorpha*, thus forming an 'intermediate' evolutionary group between the Saccharomycetaceae and CTG clade (defined by all yeast species that translate the codon CTG as serine instead of leucine) (37). However, a multigene phylogeny analysis positioned *K. pastoris* outside of the clade that contains *Brettanomyces* (39).

The classification and species nomenclature of the *Brettanomyces* genus is confusing, as yeast manufacturers have applied other species names that are incorrect and belong to an older nomenclature. For example, *B. lambicus*, which is an important microorganism in the spontaneously fermented lambic beers and Kombucha (40). However, rather than *B. lambicus*, the yeast is a strain of the species *B. bruxellensis* (41). Other synonyms present in the literature for this species are *B. abstiensis*, *B. custersii* and *B.*

intermedius (42–44). *Brettanomyces anomalus* only has one alternative name in *B. clausenii* (42). Furthermore, the teleomorph form, *D. bruxellensis* has one synonym, which in some studies is reported as *D. intermedia* (36). Since *B. bruxellensis* is the best known species within this genus, the majority of molecular/biochemical data reported here relate to this species.

Brettanomyces vs. Saccharomyces

Although the genus is phylogenetically separated from *S. cerevisiae* by 200 million years, *Brettanomyces* species share numerous phenotypes with *S. cerevisiae* that are of interest to the brewing industry, including biochemical (Crabtree effect and biosynthesis of flavour active compounds; Table 1, Figures 1 and 2) and molecular aspects (transcriptome plasticity to deal with stress inducing environments) (45). Both yeast species have converged to similar ecological niches (i.e. fruit peels, beer fermentation vessels and casks etc.) and use carbon sources through fermentation (45,46). While probably relying on different biochemical and molecular mechanisms, both species fall within the scope of interest for the beer industry, as they produce large amounts of ethanol by anaerobic fermentation (up to 14% ABV (w/v)), grow in anaerobic, acidic environments, tolerate high osmotic pressures and environments with low levels of nutrients (45,47).

Crabtree effect and ethanol yield

Like *S. cerevisiae*, *Brettanomyces* species display the Crabtree effect. Here, under aerobic conditions respiratory development is repressed ('catabolite repression') in the presence of a fermentable

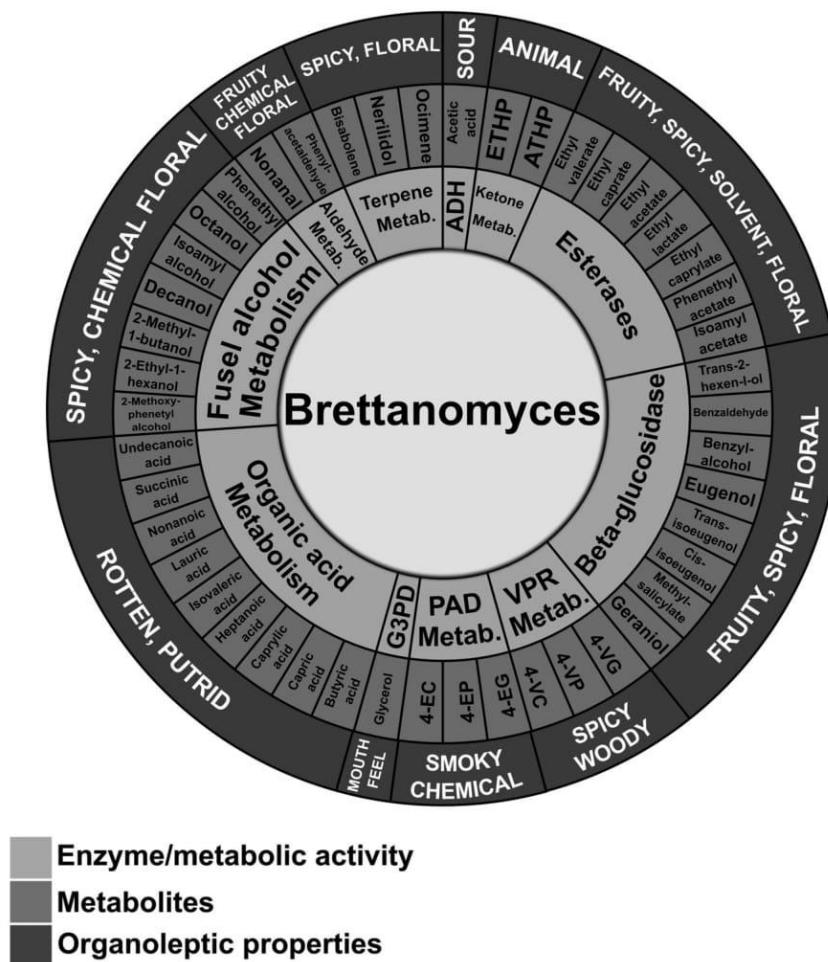


Figure 2. Aroma/flavour wheel containing the major metabolic pathways, enzymes and metabolites produced by different *Brettanomyces* species during beer fermentation. The aroma/flavours, enzymes/metabolic pathways and metabolites are indicated in the wheel by different grey shadows, defined in the legend below the wheel. Abbreviations: ADH, NAD⁺-aldehyde dehydrogenase; ETHP, 2-ethyltetrahydropyridine; ATHP, 2-acetyl tetrahydropyridine; VPR, vinylphenol reductase; 4-VG, 4-vinylguaiacol; 4VP, 4-vinylphenol; 4-VC, 4-vinylcatechol; PAD, phenylacrylic acid decarboxylase; 4-EG, 4-ethylguaiacol; 4-EP, 4-ethylphenol; 4-EC, 4-ethylcatechol; G3PD, glycerol 3-phosphate dehydrogenase; metab., metabolism (116).

Table 1. An overview of the major genetic, phenotype and metabolic characteristics of brewing strains of <i>Brettanomyces</i> species compared with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Saccharomyces pastorianus</i>			
Characteristic	<i>Brettanomyces</i> species	<i>S. cerevisiae</i> (ale yeast)	<i>S. pastorianus</i> (lager yeast)
Polyploidy (aneuploidy/euploidy) genome	Yes	Yes	Yes
Nitrate metabolism	Yes	No	No
Pseudohyphae formation (pellicle/biofilm)	Yes	Yes	No
Crabtree effect	Yes	Yes	Yes
Custer effect	Yes	No	No
α -Glucosidase activity	Yes	Yes	No
Sucrose consumption	Yes	Yes	Yes
Glucose metabolism	Yes	Yes	Yes
Fructose metabolism	Yes	Yes	Yes
Maltose metabolism	Yes	Yes	Yes
Maltotriose metabolism	Yes	Yes	Yes
Dextrin metabolism	Yes	Yes ^a	No
Cellobiose metabolism	Yes	No	No
Galactose metabolism	Yes	Yes	Yes

^aDiastatic *S. cerevisiae* brewing yeasts

carbon source at concentrations $>0.3\%$ (w/v; Table 1) (48). The Crabtree effect allows the yeast to rapidly assimilate glucose and generate ethanol, thereby inhibiting the growth of competing microorganisms. The Crabtree effect is part of the 'make–accumulate–consume' strategy used by microorganisms, where – under aerobic conditions – ethanol is consumed through respiration after glucose depletion (45,48). The Crabtree effect also provides more ATP than aerobic metabolism when high concentrations of glucose are available owing to the fast breakdown of glucose through glycolytic/fermentative pathways (48).

Genes linked to rapid growth (encoding enzymes involved in rRNA biosynthesis, the formation of pyrimidines, RNA helicases and proteins linked to RNA biogenesis and transport), respiration (encoding mitochondrial ribosomal proteins) and proteins necessary for the mitochondrial respiratory complex and ion transport to cytochrome oxidase have a fixed promoter motif (AATTTT) in closely related species of *S. cerevisiae* and *B. bruxellensis* (i.e. *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii* and *K. waltii*). Nevertheless, *S. cerevisiae* and *Brettanomyces* underwent promoter restructuring, resulting in a loss of this motif in those genes associated with respiration. The AATTTT motif is absent in a permanent position in genes linked to respiration in *S. cerevisiae* and *B. bruxellensis* (~90% of genes). Thus, a significant decrease in respiration associated gene expression has been observed during cell growth in a medium containing fermentable carbon sources, as the fermentation associated genes are expressed at higher levels than genes associated with respiration (48,49).

The Crabtree effect is an important characteristic in emergent unconventional yeasts used in the brewing industry, as it confers the ability to produce ethanol in appreciable amounts (5–15% ABV). Ethanol yield can be $>14\%$ (v/v) in fermentations using *B. bruxellensis* (48). Therefore, although there will be an impact on flavour, *Brettanomyces* can be employed in the manufacture of high gravity beers that contain a high concentration of ethanol (49–51).

Custer effect

Anaerobiosis in *Brettanomyces* species inhibits the fermentation of glucose to ethanol (52). Glucose fermentation is stimulated in the presence of oxygen or organic (H^+) acceptors (e.g. acetone, acetoin and dihydroxyacetone; Figure 1) (52,53). The inability to ferment sugars in the absence of oxygen was termed the 'negative Pasteur effect' or the Custers effect (54,55). The biochemical and molecular mechanisms that drive the Custers effect are still not fully understood. However, the continuous production of acetate from acetaldehyde promotes the accumulation of NADH, causing a redox imbalance that inhibits glycolysis and fermentation. This imbalance prolongs a lag phase when cells switch from an aerobic to an anaerobic environment, which can be ameliorated by the addition of H^+ acceptors. In the presence of oxygen/ H^+ acceptors, NADH and NADPH are oxidised during aerobic metabolism, restoring the redox balance (56). Additionally, *Brettanomyces* cells express NADH ubiquinone reductase (part of mitochondrial complex I) at high levels when growing in semi-anaerobic medium (57). Thus, in semi-anaerobic environments, more NADH generating enzymes are expressed than NAD^+ generating enzymes, which explains why the NAD^+ /NADH imbalance occurs (58). Nevertheless, some pathways partially and slowly restore the NAD^+ /NADH balance. These mechanisms involve reoxidation of NADH, thereby providing NAD^+ for the metabolism of

glyceraldehyde 3-phosphate to 1,3-bisphosphoglycerate during glycolysis. One of these features is the ability of the yeast to utilise nitrate as a sole nitrogen source, since nitrate assimilation and metabolism require NADH and NADPH as electron donors (Figure 1). Interestingly, nitrate metabolism abolishes the Custers effect, therefore improving fermentation in anaerobic environments (59). Moreover, reactions involving NADH/NADPH reoxidation include the metabolism of hydroxycinnamic acids (*p*-coumaric and ferulic acids) present in beer (19).

Saccharomyces cerevisiae does not display the Custers effect, suggesting that the fermentation associated characteristics of *Brettanomyces* evolved in a different way. The *Brettanomyces* phenotype is strictly oxygen linked, and therefore high levels of dissolved oxygen in wort should be considered to encourage growth and metabolism, particularly when *Brettanomyces* is chosen for primary fermentation (50,60).

Acetic acid synthesis

Brettanomyces species may synthesise considerable quantities of acetic acid and potentially use this compound as a non-fermentative carbon source (Figure 1) (61–64). Acetic acid acidifies the medium, inhibiting the growth of potential microbial competitors. *Brettanomyces bruxellensis* can grow at pH 2.3, compared with *S. cerevisiae*, which is limited to pH 3.2 (45). High acetic acid yields in *Brettanomyces* are associated with fermentative metabolism. Acetaldehyde is produced from pyruvate and enzymatically oxidised to acetate in response to NAD^+ -aldehyde dehydrogenase activity (Figure 1). Since acetyl-CoA synthetase activity is strongly repressed in sugar rich environments in response to the Crabtree effect, excess quantities of acetic acid are generated once the acetaldehyde is channelled towards acetate biosynthesis in place of acetyl-CoA (Figure 1) (65). Acetate biosynthesis is induced in *B. anomala* IGC 5153 in the presence of 2% (w/v) glucose, while acetic acid is not synthesised in culture medium with low sugar concentrations (65). In contrast, acetogenic *B. abstinentis* (currently *B. bruxellensis*) reportedly shows NAD^+ -aldehyde dehydrogenase activity even in the presence of low glucose concentrations, i.e. 0.3% (w/v) (52).

The presence of acetic acid is considered a positive characteristic in some types of beer, particularly in spontaneously fermented barrel aged beers such as lambic, gueuze, Flanders and Coolship ales. The amount of acetic acid produced is related to how the process is managed, particularly the choice of yeast strain and initial wort oxygenation. A high oxygen concentration stimulates the growth of *Brettanomyces* and the synthesis of acetic acid, and accordingly wort with high initial levels of oxygen will contain higher concentrations of acetic acid and form more acetate dependent esters (60,66).

Volatile esters and Brettanomyces

Esters are one of the main flavour compounds in top-fermented (ale) and bottom-fermented (lager) beers and are important in spontaneously fermented lambic beers (67–70). During beer production, several esters are produced in a yeast strain dependent manner, and their presence impacts beers either positively (fruity aroma) or negatively (solvent aroma, excessively fruity). The initial conditions of beer fermentation, such as temperature, wort composition and oxygenation, directly affect the overall concentration of esters (67–69,71).

Two groups of volatile esters are present in beer: the acetate esters and medium chain fatty acid (MCFA) ethyl esters. *Saccharomyces cerevisiae* has four enzymes that are responsible for acetate and MCFA ester formation. However, ester synthesising enzymes in *Brettanomyces* species have yet to be studied. In *S. cerevisiae*, acetate ester production depends on two enzymes: alcohol acetyl-transferase I and II (AATases I and II). MCFA ester production requires ethanol acyl-CoA/ethanol O-acyltransferase (AEATase) activity (Figures 1 and 2) (68,72–80).

While biochemical information about ester biosynthesis in *Brettanomyces* is unavailable, the data suggest that *B. bruxellensis* is capable of producing large amounts of acetate and MCFA esters (Figure 2). These esters include ethyl acetate, ethyl lactate, isoamyl acetate and phenethyl acetate (Figure 2), which are mainly found in lambic beers and American coolship ales (16,67,81). In addition, *Brettanomyces* accumulates fatty acids including octanoic (C8) to dodecanoic acid (C12) and converts them to their respective esters, suggesting elevated β -oxidation activity. The ester levels present in beer are influenced by the (possible) presence of acetic and lactic acid bacteria, whose fermentation by-products are substrates for ester synthesis (15,67). Although the formation of acetate esters was experimentally quantified utilising commercial beers supplemented with maltoligosaccharides for fermentation by eight strains of *Brettanomyces bruxellensis*, little is known about the *Brettanomyces* ester composition in pure culture fermentation (82).

Brettanomyces and the synthesis of aromatic phenolic compounds

Volatile phenols comprise a group of aromatic molecules that are often found in fermented alcoholic beverages, including beer (83). Their presence arises from the metabolism of barley and hop derived hydroxycinnamic acids during fermentation by bacteria and yeast. Like esters, volatile phenols contribute to aroma (spicy, clove and smoky) and off-flavours (phenolic, medicinal, stable and barnyard; Figure 2). Aromatic phenols are an important part of the organoleptic properties of different beer styles, such as American coolship ale, Flanders red ale, lambic, fruit lambic and Oud Bruin (all containing *Brettanomyces*) (60,84).

Brettanomyces species have the ability to produce these strong aromatic compounds using cinnamate decarboxylase and vinylphenol reductase (VPR) (Figures 1 and 2) (19,85–87). The synthesis of volatile phenols occurs in two enzymatic sequential steps: (a) decarboxylation of *p*-coumaric and ferulic acids to their corresponding hydroxystyrenes (4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol) by cinnamate decarboxylase; and (b) reduction of these molecules to 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol by vinylphenol reductase (Figure 1). In addition, 4-ethylcatechol is formed from caffeic acid in low amounts (Figure 1) (18,22). Notably, some *S. cerevisiae* strains also form hydroxystyrenes from hydroxycinnamic acids but are unable to further transform these compounds to the phenols. Hydroxystyrene synthesis arises from both phenyl acrylic acid decarboxylase (*PAD1*) and a putative ferulic acid decarboxylase (*FDC1*), which is a cinnamate decarboxylase (Figure 1) (88). The phenotype of *S. cerevisiae* strains that contain enzymes responsible for hydroxystyrene synthesis is POF⁺ (phenolic off-flavour).

Although the genes in *Brettanomyces* required for the phenolic biosynthesis have not been fully identified, two key enzymes, *DbPAD* and *DbPAD2*, with phenylacrylic acid decarboxylase activity are responsible for producing 4-vinylphenol from *p*-coumaric acid

(89,90). In order to better understand the biosynthesis of phenolic compounds in *Brettanomyces*, it is still necessary to identify all enzymes that transform hydroxystyrenes to their ethyl derivatives.

The production of ethylphenols strongly depends on the strain and environment (91). As shown by Kosel *et al.* (21) in a pure culture fermentation, hydroxycinnamic acids are quickly and completely converted to vinylphenols. However, a 30% decrease in the conversion to ethylphenols was obtained in mixed cultures with *Brettanomyces* and *S. cerevisiae*. Thus, the authors concluded that *Brettanomyces* have a metabolic preference for hydroxycinnamic acids instead of direct uptake of vinylphenols synthesised by *S. cerevisiae*. This hypothesis was corroborated by showing that VPR gene was expressed at lower levels in mixed fermentation cultures, where smaller amounts of 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol were available (21). In a recent study variations of 0.28–1.13 mg/L of 4-ethylphenol and 0.52–5.8 mg/L of 4-ethylguaiacol in lambic beers (92) were found.

Brettanomyces-associated α - and β -glucosidase activity and flavour-active aglycones

Numerous plant sensorial molecules have been identified and many of those compounds are glycosylated (e.g. flavonols, anthocyanins, monoterpenes and norisoprenoid compounds) and flavourless (93). On the other hand, the degradation of glycosylated molecules in aglycones is directly linked to fruity and/or floral aromas and flavours in beer (Figures 1 and 2) (93). Some *Saccharomyces* strains metabolise glycosides to aglycones using exo- β -glucanase (e.g. Exg1p). However, the metabolism of glycosides apparently occurs at a higher rate in *Brettanomyces* species. Daenen *et al.* identified a cell associated β -glucosidase with a broader activity in a lambic isolated *Brettanomyces custersii* strain LD72 (17). The β -glucosidase enzyme of *B. custersii* LD72 releases different aglycones, such as *trans*-2-hexen-1-ol, benzaldehyde, benzyl alcohol, eugenol, *trans*- and *cis*-isoeugenol, methyl salicylate and geraniol from the conversion of glycosides present in sour cherries (94). This study also provided preliminary evidence that amygdalin hydrolysis, resulting in the production of benzaldehyde, benzyl alcohol and benzyl acetate, occurs in response to the activity of glycoside hydrolase in some *Brettanomyces* species (Figure 2) (94).

With regard to new characteristics in beer, the biological transformation of glycosides from hops and fruits to aroma active aglycones could be offered by the use of *Brettanomyces* strains (60). Interestingly, extracellular β -glucosidase activity in *B. bruxellensis* is also associated with resveratrol production, a potential antioxidant, antimicrobial and anti-ageing compound (95). Additionally, the presence of β -glucosidase allows *Brettanomyces* species to use cellobiose – from the wood in oak barrels – as a carbon source. The last phase of lambic fermentation (13–24 months after the start of fermentation) is mainly dominated by *B. bruxellensis*, supported by the cellobiose released by wooden casks (14,96). The capacity to utilise cellobiose induces *Brettanomyces* species to form biofilms in the cask, allowing the breweries to use this *Brettanomyces* biofilm to contribute 'Brett' characteristics into the beer (50). Notably, the characteristic associated with the wort over-attenuating properties of *Brettanomyces* species is derived from the α -glucosidase activity, leading to the formulation of low calorie beers (97).

Genome organisation in *Brettanomyces* species

The genomes sequenced from different *Brettanomyces* species are currently few in number and this limits the assessment of the taxonomic diversity of the *Brettanomyces* genus. The major genome information that is available for researchers has been obtained from *B. bruxellensis* (strains AWRI1499, CBS2499, AWRI1608, AWRI1613, YV397, CBS2796, BioProject PRJEB11548 and PRJEB21262) (37,46,98). The genome sequences from *B. anomalus* (YV396) and *B. naardenensis* (CBS7540) (98) have also been reported. The lack of more genome sequences and especially a well defined sequence annotation for the *Brettanomyces* taxon has restricted other high throughput studies, including the transcriptome and proteome. Despite the lack of genome data, some initial studies have been performed by focusing on the genome structure and organisation.

B. bruxellensis has ~5400 genes with similar introns to *S. cerevisiae* and other hemiascomycetes (~4% of the genes) (37,99). Many of these genes encode enzymes and transporters related to nitrogen and lipid metabolism, allowing the yeast to survive in environments with low nutrients (37). Like *S. cerevisiae*, the *Brettanomyces* genus is able to form petite mutants resulting from mutations in the mtDNA that render them respiratory deficient (100). In terms of chromosome number, four to nine chromosomes have been identified in *B. bruxellensis* strains, with lengths from <1 to >6 Mbp (101). From the comparison of allele proportions at heterozygous sites for the five *B. bruxellensis* strains (AWRI1499, CBS2499, AWRI1608, AWRI1613 and YV397), a triploid genome has been suggested for AWRI1499 and CBS2499 and a diploid genome for AWRI1613 and YV397 (102). *B. bruxellensis* strains with a triploid genome harbour two copies of a common chromosome and an unusual set of other chromosomes (Table 1). The presence of the third chromosome copy is probably linked to sulphite resistance in wineries (102). Similarly, its occurrence provides selective advantages in nutrient-scarce and stressful environments, such as beer, where limited amounts of carbohydrates and amino acids are present, thus exerting a strong positive selection for the maintenance of polyploidy (103). Additionally, *Brettanomyces* polyploidy points to distinct hybridisation events that occurred at different geographical sites. Furthermore, the plasticity in the chromosomal structure with regard to unusual centromeres reinforces the occurrence of hybridisation (103). Avramova *et al.* reported three genetic clusters for *B. bruxellensis* strains through an analysis of 1488 isolates using micro-satellite genotyping: AWRI1499-like, AWRI1608-like and CBS 2499-like groups (103). Interestingly, *Brettanomyces* wine and beer strains have different chromosome structures that are probably linked to phenotypic differences related to adaptive advantages in wine and beer fermentation environments (103). Also, *B. bruxellensis* can be considered a diploid-triploid complex taxon with coexistence of sub-populations containing different numbers of ploidy (103).

Genes and transcription factors modulated under stress conditions in *Brettanomyces*

Brettanomyces species have been reported to tolerate more stress than *S. cerevisiae*. Indeed, *Brettanomyces* exhibits growth after primary fermentation by *S. cerevisiae* in both beer and wine, which contain high levels of ethanol and little or no dissolved oxygen

(104–108). The capacity of *Brettanomyces* species to survive such environments is linked to the cell wall structure/composition, and the presence of proteins involved in adhesion, cell wall budding and pseudohyphal growth (37,102). Moreover, *Brettanomyces* can use nitrogen sources more effectively than *S. cerevisiae* (109,110). Nitrate metabolism could be important in supporting *Brettanomyces* in beer environments as hops can provide substantial quantities of nitrate (up to 87 mg/mL) to the wort (102,111). However, not all *Brettanomyces* strains can use nitrate as their sole nitrogen source (112). The ability to use nitrate is due to the expression of genes that encode nitrate transporter (*YNT1*), nitrate reductase (*YNR1*) and nitrite reductase (*YNR1*), along with two transcription factors important for nitrate use (*YNA1* and *YNA2*).

Several genes encoding membrane associated proteins involved in alternative carbon metabolism are present in the genus, allowing *Brettanomyces* to use chitin, *N*-acetylglucosamine, galactose, mannose and lactose (37,112). Moreover, important genes involved in stress tolerance, such as *ATP1*, *ERG6* and *VPS34*, along with the stress regulators *MSN4*, *SNF1*, *HSP82* and *NTH1*, have been characterised in *B. bruxellensis* (47,113). The ability of *Brettanomyces* species to utilise trace amounts of nutrients provides some explanation for why this genus is able to survive in situations where *Saccharomyces* species are unable to survive (108). Importantly, *Brettanomyces* species have the capacity to tolerate sulphur derived compounds, particularly sulphur dioxide (101,114).

Conclusions

Brettanomyces is a genus that is attracting increased attention in the brewing world. The biochemical and molecular resources described here suggest that the potential of *Brettanomyces* species and strains exceeds our current knowledge. Consumer interest in sour, strong and highly hopped beers is increasing and *Brettanomyces* strains have the potential to contribute to production of these beer styles. The capacity of these species to tolerate environments with low nutrients, low pH and elevated stress-associated factors, such as high osmotic pressure, ethanol concentration and low levels of the nutrients, suggests their broad applicability in the brewing industry. Additionally, *Brettanomyces* species produce a diversity of phenolic and acid compounds. Furthermore, the ability of *Brettanomyces* to produce volatile compounds, such as esters and aglycones, could be explored to create a broad variety of biotransformation by-products from herbs and hop beers.

Finally, increasing interest in the biotechnological applications of yeast intra- and inter-specific hybridisation has been noted. Guided hybridisation has been performed under laboratory conditions to elucidate the evolutionary origins of yeast species and design tailor-made yeast strains for various biotechnology applications (115). *Brettanomyces*, which probably resulted from hybridisation owing to the occurrence of the triploid genome and chromosome abnormalities, might serve as a chassis to design new hybrids with biochemical and molecular resources that differ from other known yeast species.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number 302969/2016–0). The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Fagan, B.M. (1996) *The Oxford Companion to Archaeology* 2nd edition. Oxford: Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acref/9780195076189.001.0001>
- Barnett, J.A. (1998) A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789–1850, *Yeast* 14, 1439–1451. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199812\)14:16<1439::AID-YEA339>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1439::AID-YEA339>3.0.CO;2-Z)
- Boulton, C., and Quain, D. (2001). *Brewing Yeast & Fermentation*. Oxford: Blackwell. pp. 6–11. <https://doi.org/10.1002/9780470999417>
- Priest, F. G., and Campbell, I. (2003). *Brewing Microbiology*. New York: Springer Science + Business Media. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03102-4>
- Bokulich, N.A., and Bamforth, C. W. (2013) The microbiology of malting and brewing, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner R.S., and Hutzler, M. (2016) Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications, *J. Inst. Brew.* 122, 569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Gibson, B., Geertman, J.-M., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D. Louis, E. J., Magalhães, F., and Sampaio, J. P. (2017) New yeasts-new brews: Modern approaches to brewing yeast design and development, *FEMS Yeast Res.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- Claussen N. H. (1904) On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers, *J. Inst. Brew.* 10, 308–331. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1904.tb04656.x>
- Loureiro, V., and Malfaito-Ferreira, M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry, *Int. J. Food Microbiol.* 86, 23–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00246-0)
- Shimotsu, S., Asano, S., Iijima, K., Suzuki, K., Yamagishi, H., and Aizawa, M. (2015) Investigation of beer-spoilage ability of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts and development of multiplex PCR method for beer-spoilage yeasts, *J. Inst. Brew.* 121, 177–180. <https://doi.org/10.1002/jib.209>
- Wiles, A. E. (1950). Studies of some yeasts causing spoilage of draught beer, *J. Inst. Brew.* 56, 183–193. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1950.tb01531.x>
- Van Oevelen, D., L'Escaille, F., and Verachtert, H. (1976) Synthesis of aroma components during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze, *J. Inst. Brew.* 82, 322–326. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1975.tb06953.x>
- Roos, J., and Vuyst, L. (2018) Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production, *J. Sci. Food Agri.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.9291>
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., and Verachtert, H. (2003) Bioflavoring and beer refermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 140–150. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1340-5>
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., and Mills, D. A. (2012) Brew-house-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale, *PLoS One* 7, e35507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035507>
- Spaepen, M., and Verachtert, H. (1982) Esterase activity in the genus *Brettanomyces*, *J. Inst. Brew.* 88, 11–17. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1982.tb04061.x>
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F. R., Verachtert, H., and Derdelinckx, G. (2008, a) Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts, *J. Appl. Microbiol.* 104, 478–488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x>
- Cabrita, M.J., Palma, V., Patão, R., and Freitas, A. M. C. (2012) Conversion of hydroxycinnamic acids into volatile phenols in a synthetic medium and in red wine by *Dekkera bruxellensis*, *Cienc. Tecnol. Aliment.* 32(1), 106–111. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000024>
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., and Pons, M. (1992) The origin of ethylphenols in wines, *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., and Boidron, J. N. (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines, *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463–468.
- Kosel, J., Čadež, N., and Raspor, P. (2014) Factors affecting volatile phenol production during fermentations with pure and mixed cultures of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Technol. Biotechnol.* 52, 35–45.
- Edlin, D. A. N., Narbad, A., Gasson, M. J., Llody, J. R. (1998) Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*, *Enzyme Microb. Technol.* 22, 232–239. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00169-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00169-5)
- Snowdon, E. M., Bowyer, M. C., Grbin, P. R., and Bowyer, P. K. (2006) Mousy off-flavor: A review, *J. Agric. Food Chem.* 54, 6465–6474. <https://doi.org/10.1021/jf0528613>
- Blomqvist, J., and Passoth, V. (2015) *Dekkera bruxellensis* – Spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness, *FEMS Yeast Res.* 15, fov021. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov021>
- Colomer, M. S., Funch, B., and Forster, J. (2018) The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production, *Curr. Opin. Biotechnol.* 56, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
- Joseph, L. C. M., Albino, E., and Bisson, L. F. (2017) Creation and use of a *Brettanomyces* Aroma Wheel, *Catalyst* 1, 12–20. <https://doi.org/10.5344/catalyst.2016.16003>
- Gilliland, R. (1961) *Brettanomyces*. I. Occurrence, characteristics, and effects on beer flavor, *J. Inst. Brew.* 67, 257–261. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1961.tb01791.x>
- Custers, M.T.J., (1940). Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*. Delft University, Delft.
- Boekhout, T., Kurtzman, C. P., O'Donnell, K., and Smith M. T. (1994) Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (anamorph *Brettanomyces*), and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 781–786. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-781>
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., and Comi, G. (2004) Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1347–1355. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1347-1355.2004>
- Oelofse, A., Pretorius, I. S., du Toit, M. (2008) Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: A synoptic review, *South African J. Enol. Vitic.* 29, 128–144.
- Péter, G., Dlauchy, D., Tóbiás A. Fülöp L., Podgoršek, M., and Čadež, N. (2017) *Brettanomyces acidodurans* sp. nov., a new acetic acid producing yeast species from olive oil, *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 657–664. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0832-8>
- Meyer, S. A., Smith, M. T., and Simone, F. P. (1978) Systematics of *Hanseniaspora* Zikes and *Kloeckera* Janke, *Antonie Van Leeuwenhoek* 44, 79–96. <https://doi.org/10.1007/bf00400078>
- Van der Walt, J. P. (1984). *Dekkera* van der Walt, in *The Yeasts, a Taxonomic Study* (N. J. W. Kreger-van Rij Ed.), 3rd ed., pp. 146–150, Elsevier Science, Amsterdam.
- Yamada, Y., Takinami-Nakamura, H., Tahara, Y., and Smith, M. T. (1980). The coenzyme Q system in the classification of the ascosporogenous yeast genus *Dekkera* and the asporogenous yeast genus *Brettanomyces*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 46, 595–599. <https://doi.org/10.1007/bf00394015>
- Smith M. T. H., Yamazaki M., and Poot G. A. (1990) *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eeniella*: Electrophoretic comparison of enzymes and DNA–DNA homology, *Yeast* 6, 299–310. <https://doi.org/10.1002/yea.320060403>
- Curtin, C. D., Borneman A.R., Chambers, P.J., and Pretorius, I. S. (2012) De-novo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499, *PLoS ONE* 7, e33840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033840>
- Curtin, C. D., Pretorius, I.S., (2014). Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*, *FEMS Yeast Res.* 14, 997–1005. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12198>
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (2013) Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species, *FEMS Yeast Res.* 13, 23–33. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12006>
- Ashrafi, A., Jokar, M., and Nafchi A. M. (2018) Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging, *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.12.028>
- Molina F. I., Shen, P., and Jong, S.C. (1993) Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding

- for rRNA, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 32–35. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-32>
42. Barnett, J. A., and Lichtenthaler, F. W., (2001). A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880–1900, *Yeast* 18, 363–388. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20010315\)18:4%3C363::AID-YEA677%3E3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20010315)18:4%3C363::AID-YEA677%3E3.0.CO;2-R)
43. Put, H., De Jong, J., Sand, F., and Van Grinsven, A., (1976). Heat resistance studies on yeast spp. causing spoilage in soft drinks, *J. Appl. Bacteriol.* 40, 135–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1976.tb04162.x>
44. Verachtert, H., (1992). Lambic and gueuze brewing: Mixed cultures in action, *COMETT Course on Microb. Cont.*, Helsinki, pp. 243–262.
45. Rozpedowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., Piskur, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts, *Nat. Commun.* 2, 302. <https://doi.org/10.1038/ncomms1305>
46. Piškur, J., Ling, Z., Marcet-Houben M., Ishchuk, O. P., Aerts, A. LaButti, K., Copeland, A., Lindquist, E., Barry, K., Campagno, C., Bisson, L., Grigorev, I. V., Gabaldón, T., and Phister, T. (2012) The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties, *Int. J. Food Microbiol.* 157, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.008>
47. Nardi, T., Remize, F., and Alexandre, H. (2010) Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: A comparative study of stress genes expression, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 925–937. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2786-x>
48. De Deken, R. H. (1966) The Crabtree effect: A regulatory system in yeast, *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>
49. Galafassi, S., Merico, A., Pizza, F., Hellborg, L., Molinari, F., Piškur, J., and Compagno, C. (2010) *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1079–1088. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0885-4>
50. White, C. and Zainasheff, J. (2010) *Brettanomyces*, in *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. 1st ed., pp. 61–64. Brewers Association, Boulder, CO, USA.
51. Stewart, G. G. (2017) Stress effects on yeast during brewing and distilling fermentations: High gravity effects, in *Brewing and Distilling Yeasts. The Yeast Handbook*. (Stewart, G.G. Ed.) 1st ed., pp.199–240, Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8>
52. Carrascosai, J. M., Viguera, M. D., de Castro, N. I., and Scheffers, W. A. (1981). Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast *Brettanomyces abstinentis*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 47, 209–215. <https://doi.org/10.1007/bf00403392>
53. Wijsman, M. R., van Dijken, J. O., van Kleeff, B. H. A., and Scheffers, W. A. (1984) Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic condition (Custers effect), *Antonie Van Leeuwenhoek* 50, 183–190. <https://doi.org/10.1007/BF00400180>
54. Wikén, B. J. A., and Entian, K. D. (2005). A history of research on yeasts – 9: Regulation of sugar metabolism, *Yeast* 22, 835–894. <https://doi.org/10.1002/yea.1249>
55. Wikén, T., Scheffers, W., and Verhaar, A. (1961). On the existence of a negative Pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer, *Antonie Van Leeuwenhoek* 27, 401–433. <https://doi.org/10.1007/bf02538468>
56. Gaunt, D. M., Degen, H., and Lloyd D. (1988) The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic carbon dioxide production in *Brettanomyces anomalus*, *Yeast* 4, 249–255. <https://doi.org/10.1002/yea.320040403>
57. Tiukova, I. A., Petterson, M.E., Tellgren-Roth, C., Bunikis, I., Eberhard, T., Petterson, O. V., and Passoth, V. (2013) Transcriptome of the alternative ethanol production strain *Dekkera bruxellensis* CBS 11270 in sugar limited, low oxygen Cultivation, *PLoS ONE* 8, e58455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058455>
58. Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K. J. (2015) *Brettanomyces* yeasts – From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations, *Int. J. Food Microbiol.* 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
59. Galafassi, S., Capusoni, C., Moktaduzzaman, M., and Compagno, C. (2013) Utilization of nitrate abolishes the ‘Custers effect’ in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 297–303. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1229-3>
60. Tonsmeire, M. (2014) 100% *Brettanomyces* fermentations, in *American Sour Beer: Innovative Techniques for Mixed Fermentations*. 1st ed., pp. 181–195. Brewers Association, Boulder, CO.
61. Gamero A., Ferreira V., Pretorius I.S., Querol A. (2014) Wine, beer and cider: unravelling the aroma profile, in: *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism* (Piškur J., and Compagno C. Eds.). 1st ed., pp. 261–297, Springer, Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55013-3_10
62. Freer, S. N. (2002). Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 271–275. <https://doi.org/10.1023/A:1022592810405>
63. Freer, S. N., Dien, B., and Matsuda, S. (2003) Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 101–105. <https://doi.org/10.1023/A:1022592810405>
64. Castro-Martinez, C., Escudero-Abarca, B.I., Gomez Rodriguez, J., Hayward-Jones, P.M., and Aguilar-Uscanga, M.G., (2005) Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains, *J. Food Process Eng.* 28, 133–143. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2005.00393.x>
65. Gerós, H., Azevedo, M. M., and Cássio, F. (2000) Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*, *Food Technol. Biotechnol.* 38, 59–62.
66. Sparrow, J. (2005) Wild fermentation, in *Wild Brews: Beer beyond the Influence of Brewer's Yeast*. 1st ed., pp. Brewers Publications, Boulder, CO.
67. Spaepen B. M., Oevelen, D. V., and Verachtert, H. (1978) Fatty acids and esters produced during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze, *J. Inst. Brew.* 84, 278–282. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1978.tb03888.x0>
68. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T and Vicente A. A. (2014) Yeast: the soul of beer's aroma – A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
69. Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., and Delvaux, F. R. (2003) Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer, *J. Biosci. Bioeng.* 96, 110–118. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
70. Xu, Y., Wang, D., Hong Li, Hao, J., and Jiang, W. (2017) Flavor contribution of esters in lager beers and an analysis of their flavor thresholds, *J. Am. Soc. Brew Chem.* 75, 201–206. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-3007-01>
71. Hiralal, L., Olaniran, A. O., and Pillay, B. (2013) Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions, *J. Biosci. Bioeng.* 117, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.06.002>
72. Yoshioka, K., and Hashimoto, N. (1981) Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewer's yeast, *Agric. Biol. Chem.* 45, 2183–2190. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864861>
73. Malcorps, P., and Dufour, J. P. (1992) Short-chain and medium-chain aliphatic- ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* 210, 1015–1022. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17507.x>
74. Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y., and Hamachi, M. (1994) Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2786–2792.
75. Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Hamachi, M., and Kumagai C (1998) Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene (ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1852–1857. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1852>
76. Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Ito, C., Sone, H., Kaneko, Y., and Tamai, Y. (1998) Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*, *J. Ferment. Bioeng.* 86, 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80027-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80027-5)
77. Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Vanderhaegen, B. M., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R. (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5228–5237. <https://doi.org/10.1128/aem.69.9.5228-5237.2003>

78. Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I.S., and Agosin, E. (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 675–687. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1194-3>
79. Dekoninck, T., Verbelen, P. J., Delvaux, F., Van Mulders, S. E., Delvaux, R. F. (2012) The importance of wort composition for yeast metabolism during accelerated brewery fermentations, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70, 195–204. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1966-1>
80. Zhang, C.-Y., Liu Y.-L., Qi, Y.-N., Zhang, J.-W., Dai, L.-H., Lin, X., Xiao, D.-G. (2013) Increased esters and decreased higher alcohols production by engineered brewer's yeast strains, *Eur. Food Res. Technol.* 236, 1009–1014. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1966-1>
81. Yakobson, C. M., (2009). *Pure Culture Fermentation Characteristics of Brettanomyces Yeast Species and their Use in the Brewing Industry*. School of Life Sciences, Heriot-Watt University, Edinburgh.
82. Crauwels, S., Opstaele, F. V., Jaskula-Goiris, B., Steensels, J., Verreth, C., Bosmans, L., Paulussen, C., Herrera-Malaver, B., Jonge, R., Clippeleer, J., Marchal, K., Samblanx, G., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., Aerts, G., and Lievens, B. (2017) Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains, *FEMS Yeast Res.* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow105>
83. Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., and Delvaux, F. R. (2008) Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts, *Food Chem.* 107, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>
84. Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., and Thevelein, J. M. (2018) Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations, *Food Microbiol.* 72, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
85. Heresztyn T. (1986) Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast, *Arch. Microbiol.* 146, 96–98. <https://doi.org/10.1007/BF00690165>
86. Tchobanov, I., Gal, L., Guilloux-Benatier, M., Remize, F., Nardi, T., Guzzo, J., Serpaggi, V., and Alexandre, H. (2008) Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 213–217. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01192.x>
87. Harris, V., Ford, C. M., Jiranek, V., and Grbin, P. R. (2009) Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 1117–1127. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1708-7>
88. Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., and Iefuji, H. (2010) PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.* 109, 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.011>
89. Godoy, L., García, V., Peña, R., Martínez, C., and Ganga, M. A. (2014) Identification of the *Dekkera bruxellensis* phenolic acid decarboxylase (PAD) gene responsible for wine spoilage, *Food Control* 45, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.041>
90. González, C., Godoy, L., and Ganga, M. A. (2017) Identification of a second PAD1 in *Brettanomyces bruxellensis* LAMAP2480, *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 291–296. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0793-3>
91. Lentz, M., and Harris, C. (2015) Analysis of growth inhibition and metabolism of hydroxycinnamic acids by brewing and spoilage strains of *Brettanomyces* yeast, *Foods*, 4, 581–593. <https://doi.org/10.3390/foods4040581>
92. Witrick, K. T., Duncan, S. E., Hurley, K. E., O'Keefe, S. F. (2017) Acid and volatiles of commercially-available lambic beers, *Beverages*. 3, 51 <https://doi.org/10.3390/beverages3040051>
93. Sarry, J.-E., and Günata, Z. (2004) Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors, *Food Chem.* 87, 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.003>
94. Daenen, L., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., and Derdelinckx, G. (2008) Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers, *FEMS Yeast Res.* 8, 1103–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00421.x>
95. Kuo, H.-P., Wang, R., Huang, C.-Y., Lai, J.-T., Lo, Y.-C., and Huang, S.-T. (2018) Characterization of an extracellular β -glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production, *J. Food Drug Anal.* 26, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.12.016>
96. Verachtert, H., and Dawoud, E. (1984) Microbiology of lambic-type beers, *J. Appl. Bacteriol.* 57, R11–R12.
97. Kumara, H. M. C. S., De Cort, S., and Verachtert, H. (1993) Localization and characterization of α -glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2352–2358.
98. Vervoort, Y., Herrera-Malaver, B., Mertens, S., Guadalupe Medina, V., Duitama, J., Michiels, L., Derdelinckx, G., Voordeckers, K., and Verstrepen, K. J. (2016) Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus* β -glucosidase and its potential for bioflavouring, *J. Appl. Microbiol.* 121, 721–733. <https://doi.org/10.1111/jam.13200>
99. Woolfit, M., Rozpdowska, E., Piškur, J., and Wolfe, H. K. (2007) Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*, *Eukaryot. Cell* 6, 721–733. <https://doi.org/10.1128/EC.00338-06>
100. McArthur, C. R., and Clark-Walker, G. D. (1997) Mitochondrial DNA size diversity in the *Dekkera/Brettanomyces* yeasts, *Curr. Genet.* 7, 29–35. <https://doi.org/10.1007/BF00365677>
101. Hellborg, L., and Piškur, J. (2009) Complex nature of the genome in a wine spoilage yeast, *Dekkera bruxellensis*, *Eukaryot. Cell* 8, 1739–1749. <https://doi.org/10.1128/EC.00115-09>
102. Borneman, A. R., Zeppel, R., Chambers, P. J., and Curtin, C. D. (2014) Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates, *PLoS Genet.* 10, e1004161. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004161>
103. Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., and Masneuf-Pomarede, I. (2018) *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution, *Nature* 8, 4136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
104. Curtin, C. D., Bellon, J. R., Coulter, A., Cowey, G., Robinson, E., de Barros Lopes, M. A., Godden, P. W., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. (2005) The six tribes of 'Brett' in Australia – Distribution of genetically divergent *Dekkera bruxellensis* strains across Australian winemaking regions, *Aus. Wine Ind. J.* 20, 28–36.
105. Curtin, C. D., Bellon, J. R., Henschke, P. A., Godden, P. W., and De Barros Lopes, M. A. (2007) Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries, *FEMS Yeast Res.* 7, 471–481. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00183.x>
106. Curtin, C., Kennedy, E., and Henschke, P. A. (2012) Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* wine isolates, *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03257.x>
107. Curtin, C. D., Langhans, G., Henschke, P. A., Grbin, P. R. (2013). Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma, *Food Microbiol.* 36, 241–247 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.008>
108. Smith B. D., and Divol, B. (2016) *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages, *Food Microbiol.* 59, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>
109. Conterno, L., Joseph, C. M. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T., and Bisson, L. F. (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines, *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.
110. de Barros Pita, W., Leite F. C., de Souza Liberal, A. T., Simões, D. A., and de Moraes, M. A. Jr. (2011) The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes, *Antonie Van Leeuwenhoek* 100, 99–107. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9568-z>
111. Kippenberger, M., Hanke, S., Biendl, M., Stettner, G., and Lagemann, A. (2014) Transfer of nitrate and various pesticides into beer during dry hopping, *Brew. Sci.* 67, 1–9.
112. Crauwels, S., Zhu, B., Steensels, J., Busschaert, P., Samblanx, G. D., Marchal, K., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., and Lievens, B. (2014) Assessing genetic diversity among *Brettanomyces* yeasts by DNA fingerprinting and whole-genome sequencing, *Appl. Environ. Microbiol.* 8, 4398–4413. <https://doi.org/10.1128/AEM.00601-14>
113. Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., and Volonteri, G. (2008) Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions, *FEMS Yeast Res.* 8, 1087–1096. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00395.x>

114. Vigentini, I., Lucy Joseph, C. M., Picozzi, C., Foschino, R., and Bisson, L.F. (2013) Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure, *FEMS Yeast Res.* 13, 597–608. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12060>
115. Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., and Gibson, B. (2017) Novel brewing yeast hybrids: Creation and application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 65–78. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8007-5>
116. Joseph, C. M. L., Albino, E. A., Ebeler, S. E., and Bisson, L. F. (2015) *Brettanomyces bruxellensis* aroma-active compounds determined by SPME GC-MS olfactory analysis, *Am. J. Enol. Vitic.* 66, 379–387. 1 <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.14073>

CURRICULUM VITÆ resumido

MENONCIN, M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Marcelo Menoncin

Local e data de nascimento: Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil, 01/07/1992

Endereço profissional: Rua Provenzano, 333

Telefone profissional: (51) 993414313 E-mail: menoncin.marcelo@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

- Bacharelado em Ciências Biológicas (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011-2016);
- Tecnologia Cervejeira (Instituto da Cerveja Brasil) (2017).

3. ESTÁGIOS:

- Laboratório de Palinologia, Departamento de Botânica da UFRGS (2011-2013): Construção de exsicatas e uma palinoteca informatizada. Orientação: Maria Luisa Lorscheitter;
- Bolsista de Iniciação Científica - GELC (Grupo de Estudos com Leveduras Cervejeiras) (2013-2016): Avaliação de biomarcadores de vitalidade em diferentes leveduras cervejeiras. Orientação: Diego Bonatto;
- Cervejaria Seasons (2015-2016): Estágio no setor de produção, construção de um laboratório e implementação de controle de qualidade na cervejaria. Responsável: Leonardo Sewald.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

- 2014 Destaque XXVI Salão de Iniciação Científica, UFRGS.

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

- Cervejaria Seasons (2016 - Atual): Celetista (Laboratorista).
- Cocriador do projeto *Acowdemy*, iniciativa de cursos e workshops da Cervejaria Seasons.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS:

LORSCHUITTER, M. L.; ROTH, L.; MASETTO, E.; MENONCIN, M. & BAUM, G. Palinotecas do Laboratório de Palinologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. *Boletín de la asociación latinoamericana de paleobotánica y palinología*, 14: 141-154, 2014.

MENONCIN, M. & BONATTO, D. Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(4): 402-411, 2019.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

MENONCIN, M. & BONATTO, D. 6ta. JORNADAS SUDAMERICANAS DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA DE LEVADURAS. Aspectos Moleculares e Bioquímicos da fermentação com *Brettanomyces* aplicada na Indústria Cervejeira. 2018.

MENONCIN, M. & BONATTO, D. International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY34). Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* fermentation employed in beer industry. 2018.